

Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular

Modulación de la estabilidad de la quinasa de  
receptores acoplados a proteínas G (GRK2)  
por la ligasa Mdm2: implicaciones fisiológicas  
en la migración y la proliferación celular

Alicia Salcedo de Haro

Memoria presentada por la licenciada  
ALICIA SALCEDO DE HARO  
Para aspirar al grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS

Directores de esta tesis:

Dr. Federico Mayor Menéndez  
Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular  
Y

Dra. Petronila Penela Márquez  
Investigadora contratada del programa Ramón y  
Cajal.

Madrid, 2007

A mis hermanas.  
Porque me hubiera gustado ser la del medio.

“Descubrir algo significa mirar lo mismo que está viendo todo el mundo, y percibirlo de manera diferente”.

Albert Szent-Györgyi, 1893-1986.

“El pensamiento inteligente pasa por incluir a los demás”.

Dr. Alberto Corsín Jiménez.

## AGRADECIMIENTOS



Cualquiera que se haya enfrentado alguna vez a la página en blanco sabrá a qué me refiero cuando la torpeza del lenguaje y las dudas se mezclan entre sí evitando intensamente la satisfacción de un buen comienzo. Aquellos que hayan resumido cinco años de su vida también entenderán la dificultad del proceso. En contra de lo esperable, y mirando desde esta perspectiva, desde el final de la escritura, me resulta casi más difícil llenar esta hoja que todas las que la suceden. En esta memoria, como en cualquier otra se incluyen todos los resultados concluyentes y en cierto modo positivos, omitiendo los fallidos y a la vez superiores. La gente que me ha acompañado durante todos estos años es mucha y todos me han ayudado a sobrellevar y a reírme de los castigos de la ciencia.

No sé si seremos nosotros, el espacio del laboratorio tan justo o las horas que hemos pasado juntos, pero los lazos establecidos han sido y son muy estrechos.

Fede, en primer lugar me gustaría agradecerle el haberme dado la oportunidad de trabajar contigo y tu equipo. Por darme a elegir, por tu conversación, dedicación, consejos y críticas, tu experiencia y sobre todo tu paciencia con mi caos, mis despistes y mis fechas más que límite.

A ti Nila, por haberme enseñado todo lo que sé, por lo que he aprendido de ti en lo profesional y en lo personal, por tu increíble constancia y dedicación conmigo en todos los aspectos, porque todo este trabajo ha sido siempre debatido y discutido. Por tu pedagogía, tu confianza, apoyo, y comprensión.

A todos los que me habéis ayudado con problemas técnicos que por desgracia ocurren en el peor momento, al servicio de mantenimiento y de instrumentación, especialmente a Paco y a Fernando por vuestra disposición y eficacia, al equipo de seguridad biológica por su simpatía, alegría y muchos días juntas, a Cruz, Gema, Miguel y Jose.

A Mada, Adela, Gloria y Reyes por vuestro buen humor todos los días del año y por solucionar todos los problemas logísticos y de nervios de última hora.

A Manolo Serrano, Pepe Cuezva y David Hardisson por la amable cesión de material, líneas celulares y su ayuda.

A Grego, porque todos los días a partir de las cinco viene al labo un pedacito de alegría.

A Susana por tu ayuda y tu esfuerzo en beneficio de todos. A Cristina, Pedro y Raúl por la compañía, las charlas y todos los momentos juntos.

A mis amigos emigrantes, porque no se imaginan el hueco que dejan detrás. Por mucho tiempo que pase se sigue notando vuestra ausencia. A Érica por su entusiasmo por la ciencia,

a José por ese intercambio musical y porque fuiste el primero en irte.

A Alfred por todo, porque ya fue una suerte conocerte en la carrera, porque encontrarte casi de madrugada en virus era la mejor manera de empezar el día, por tu manera de ser y por tu ayuda dentro y fuera del CBM. ¡¡Gracias amigo!!.

Al pequeño Guzmán, porque llegó y nos conquistó a todos.

A mi querida amiga Espe, porque sigo echando de menos tus canciones, tu compañía, tu alegría y tu ayuda.

A nuestro gallo Ant, porque todavía creo que está en su sitio, por lo bien que lo hemos pasado y porque sin ti no nos enteramos de nada de lo que pasa en el CBM.

A Sandra, porque nunca he conocido a nadie como tu. Porque atrapas a todo el que te rodea con tu risa contagiosa y tu energía, porque echo de menos los trayectos en coche juntas a casa, el patinaje, las cañas y el consejo de sabias.

A Esther y Julio porque os fuisteis muy pronto y por los buenos tiempos.

A los del 340, a Mari Carmen, Juan, Javi, Jorge, Carlitos, Junior y Jesús por las comidas, las "happy hours" y la colaboración permanente que tenemos.

A Aitorcito porque casi se está yendo y ya echo de menos las largas charlas en el pasillo.

A mis amigos de otros labos que han conseguido que el trabajo sea divertido, a Mar, a Elena, a Alberto, a Vega, a Laura Perla, Juanfra, Chus, Maite, Gloria, Isabella y Juanjo.

Al chirly porque pronto te toca a ti y por tu gran compañía en cultivos.

A Elvira porque contigo al lado todo es más fácil, por las carreras por el campus y el desahogo que implicaba. Por tu consuelo, apoyo, ayuda, alegría y optimismo.

A Alberto, físico entre biólogas siempre dispuesto a alegrarnos el día.

A mis compañeros de labo que han sido mucho más que eso, mis amigos.

A ti Ruiz por haberme ayudado siempre, por tus explicaciones y consejos científicos y personales.

A Cati por tu bondad, alegría e incansable forma de ayudar.

A María, porque me ha encantado conocerte mejor, por tu disposición y tus favores, me has ayudado mucho en esta última etapa.

A Ivette y a Vero, porque siempre reís, los descansos con vosotras recargan las pilas para volver al tajo. Me alegro de que hayáis venido.

A Carlota y a Helena, porque os habéis con-

vertido en imprescindibles en mi vida, porque siempre estáis en lo bueno y en lo malo desde el principio hasta el final. ¡¡¡¡Porque fue una suerte inesperada encontraros y habéis sido lo mejor de estos años!!!!

Fuera del laboratorio también ha habido mucha gente que me ha mantenido a flote desde hace mucho.

A los amigos de Javi porque sois mis amigos y así me lo habéis demostrado siempre. Porque vuestra generosidad, entusiasmo, energía y compañía se ha vuelto esencial. A Mendaro (gracias por todo), a Manolo, Pablo, Paué, García, Nacho, Chus, Muñoz, Raquel, Susana, Lucía, Norma, Esther, Patricia. A Edu, Noni, Marcos, Adri, Almu y Huguito porque sois increíbles.

A Arturo por acogerme en el despacho los días más flojos dándome compañía y ánimos.

Y por supuesto a los que son mi seguro de vida, los que siempre estáis a mi lado y sois simplemente irremplazables. Porque no sé qué habré hecho bueno para recibir la mejor recompensa de estar junto a vosotros. Porque hemos crecido y vivido todo juntos.

A mis amigos Moraireros porque con vosotros siempre me siento de vacaciones. A Marisa, Quique, Pablo, Ernest, Angela, Dani, Vicentín, Noe y Javi.

A Jaime, Ana, Inés, Alfonso, Falele, Eli, Esther, Alex, Nacho, Paco y Tinino.

A Vane, por los trabajos, las charlas, los cafés, los exámenes, las cañas, los apuntes, las largas conversaciones telefónicas.

A Isaac, mi compañero inseparable de carrera. Porque eres lo mejor que me ha dado la biología.

A Elvich porque eres especial y esencial, por tu imparcialidad e inteligencia.

A Isa. O. porque ya hace 25 años y parece que fue ayer.

A Eloy por tu preocupación y lo bien que nos conocemos, a Miguel y a David.

A mi amigo Charly, Carlos, Carlitos, Litos por todos estos años, porque todo contigo es mejor, por los conciertos, las cañas, los vinos, los bailes, las charlas y sobretodo por perdonar todos mis errores.

A María por ser excep y porque después de tanto tiempo podamos con todo juntas.

A Luca, porque no importa lo lejos que estés que siempre noto tu apoyo.

A Juan y a Miguel porque yo también os elijo.

A mi amigo Luigi porque llegaste para quedarte para siempre.

A Isa y a Helen por ser mi sustento. Por-

que sois como mis hermanas y porque es para siempre.

A Joaquín porque de mis 69 primos te nombro a ti.

A mi familia, porque no se elige y a pesar de eso no querría otra, mis tíos, mis primos y sobretodo a mis padrinos, abuelos y abuela porque de tantos que somos tienen tiempo y cariño para todos.

A José.

A mi hermana Marta, porque has sido y eres todo mi mundo. Por vivir todo conmigo tan intensamente y porque eres exactamente lo que quiero llegar a ser.

A mi madre y a mi padre, con vosotros tengo que resumir porque no existe espacio suficiente para agradecer todo lo que habéis hecho por mi. Porque vuestra entrega desinteresada con todo el que os rodea os rejuvenece como si no hubierais experimentado decepción alguna.

Y por supuesto a Javi, porque esta tesis la hemos sufrido y celebrado los dos repetidamente, por aguantar mis nervios y miedos durante todo este tiempo. Porque le das sentido a todo y por ser la mejor persona que conozco.



|   |    |
|---|----|
| ABREVIATURAS.....   | 1  |
| SUMMARY.....  | 3  |
| INTRODUCCIÓN.....   | 4  |
| 1.- $\beta$ -arrestinas.....  | 6  |
| 1.1.- Isoformas, estructura y función.....  | 7  |
| 1.2.- $\beta$ -arrestinas como moléculas de señalización.....   | 8  |
| 1.3.- Regulación de MAPK.....   | 8  |
| 2.- GRKs.....   | 10 |
| 2.1.-Estructura, distribución y especificidad de sustrato.....  | 10 |
| 2.2.- Papeles funcionales de GRKs.....  | 11 |
| 2.2.1.- Fosforilación de sustratos no GPCRs.....  | 12 |
| 2.2.2.- Regulación de otras proteínas de señalización independiente-<br>mente de fosforilación.....           | 12 |
| 2.3.- Regulación de GRKs.....   | 12 |
| 2.3.1.- Regulación mediada por proteínas y factores de interacción.....                                       | 13 |
| 2.3.1.1- Regulación alostérica de la actividad catalítica de<br>GRK2 y GRK3 por $G\beta\gamma$ y lípidos..... | 13 |
| 2.3.2.- Regulación de la interacción con GPCRs y $G\alpha$ .....  | 13 |
| 2.3.3.- Regulación de GRKs por proteínas de unión con calcio.....   | 14 |
| 2.3.4.- Regulación por caveolina.....   | 14 |
| 2.4.-Regulación de la actividad de GRKs por modificaciones post-traduccion-<br>ales.....                      | 15 |
| 2.4.1.- Regulación de GRKs dependiente de las quinasas de segundos<br>mensajeros PKC y PKA.....               | 15 |
| 2.4.2.- Regulación de GRKs dependiente de c-Src y MAPK.....   | 16 |
| 2.4.3.- Regulación por S-nitrosilación.....   | 16 |
| 2.5.- Regulación de los niveles de expresión de GRK2.....   | 16 |
| 2.5.1.- Regulación a nivel transcripcional.....   | 17 |
| 2.5.2.- Regulación de la expresión de GRK2 a nivel traduccional.....  | 17 |
| 2.5.3.- Regulación de la estabilidad de GRK2.....   | 18 |
| 3.- Degradación proteica por la vía del proteasoma.....   | 18 |
| 3.1.- Complejo del proteasoma.....  | 19 |
| 3.2.- Mdm2.....   | 21 |
| OBJETIVOS. ....   | 25 |
| MATERIALES Y MÉTODOS.....   | 26 |
| 1.- Materiales.....   | 27 |
| 2.- Cultivos celulares.....   | 27 |
| 2.1.- Líneas celulares establecidas.....  | 27 |
| 2.2.- Plásmidos utilizados.....   | 28 |
| 2.3.- Transfecciones.....   | 28 |
| 2.4.- Infección de células con Adenovirus.....  | 29 |
| 3.- Selección de células transfectadas con el método Dynabeads.....   | 29 |
| 4.- Marcaje metabólico con [ $^{35}\text{S}$ ]-metionina. Experimentos de “pulso y caza”.....                 | 29 |
| 5.-Tratamientos celulares.....  | 29 |
| 5.1.- Estimulación con isoproterenol.....   | 29 |

|   |    |
|---|----|
| 5.2.- Tratamiento con Betaxolol.....  | 29 |
| 5.3.- Tratamiento con IGF-1.....  | 29 |
| 5.4.- Tratamiento con LY294002.....   | 30 |
| 5.5.- Tratamiento con ML-9.....   | 30 |
| 5.6.- Tratamiento con cicloheximida.....  | 30 |
| 5.7.- Tratamiento con Leptomicina B.....  | 30 |
| 6.- Fraccionamiento celular.....  | 30 |
| 7.- Electroforesis:.....  | 30 |
| 7.1.-Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.....   | 30 |
| 7.2.-Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa-TAE.....  | 30 |
| 8.-Inmunodetección, inmunoprecipitación e inmunofluorescencia.....  | 30 |
| 8.1.-Inmunodetección tras electroforesis (“Inmunoblot”).....  | 30 |
| 8.2.-Inmunoprecipitación.....   | 31 |
| 8.3.-Anticuerpos utilizados.....  | 31 |
| 9.- Purificación de la proteína de fusión GST-Mdm2 y mutantes.....  | 33 |
| 10.- Fosforilación “in vitro” de Mdm2.....  | 33 |
| 11.- Ensayo de asociación “in vitro”.....   | 33 |
| 12.- Ensayos de migración.....  | 34 |
| 13.- Ensayos de invasión.....   | 34 |
| 14.- Ensayos de proliferación celular.....  | 34 |
| 15.- Procesamiento de tumores de pacientes con carcinoma ductal de mama.....  | 34 |
| 16.- Medida de proteínas.....   | 35 |
| 17.-Tratamiento matemático y estadístico de los datos.....  | 35 |
| RESULTADOS.....   | 36 |
| 1- Implicación de Mdm2 en la degradación de GRK2.....   | 37 |
| 1.1.-Mdm2 se asocia a GRK2 y esta asociación se ve favorecida por la estimulación de $\beta$ 2-AR y por la presencia de $\beta$ -arrestina.....   | 37 |
| 1.2.- Mdm2 promueve la degradación de GRK2 por la vía del proteasoma.....   | 38 |
| 1.3.-Mdm2 modula la ubiquitilación de GRK2.....   | 40 |
| 1.4.-La degradación de GRK2 se inhibe en ausencia de Mdm2.....  | 44 |
| 2.- Mecanismos moleculares de la participación de $\beta$ -arrestina en la degradación de GRK2 por Mdm2.....  | 45 |
| 2.1.- Efecto diferencial de un mutante de $\beta$ -arrestina 1 y su equivalente de $\beta$ -arrestina 2 en la degradación de GRK2.....  | 45 |
| 2.2.- GRK2 y $\beta$ -arrestinas compiten por Mdm2 en el entorno del receptor.....  | 46 |
| 2.3.- La fosforilación de GRK2 por c-Src o ERK no modula la degradación dependiente de Mdm2.....  | 49 |
| 2.4.- Identificación de ligasas implicadas en modular la estabilidad de GRK2 dependientes de fosforilación.....   | 51 |
| 3.- Regulación de la estabilidad de GRK2 por el receptor de IGF-1.....  | 52 |
| 3.1.- La estabilidad de GRK2 está regulada por la señalización de IGF-1.....  | 52 |
| 3.2.- La regulación de la expresión de GRK2 por IGF-1 implica a la vía de PI3K/ AKT/ Mdm2, debiéndose exclusivamente a cambios en la degradación y no en la síntesis de la proteína GRK2..... | 54 |
| 3.3.- La regulación de GRK2 por la vía dependiente de PI3K/ AKT es clave en determinar la modulación de los niveles de expresión de GRK2 por Mdm2 en células tumorales.....                   | 55 |
| 4.- Repercusiones funcionales de variaciones en los niveles de GRK2.....  | 57 |

|  |    |
|--|----|
| 4.1.- GRK2 participa en la migración celular de MCF-7 en respuesta a fibronectina  | 59 |
| 4.2.- La respuesta migratoria de células epiteliales de mama transformadas se ve afectada por variaciones en los niveles de GRK2 en respuesta a distintas señales que estimulan la actividad de AKT..... | 60 |
| 4.3.- GRK2 potencia la capacidad invasiva de diversas células tumorales de mama con distintos grados de transformación.....  | 62 |
| 4.4.- Los niveles de GRK2 afectan a la tasa de proliferación celular.....  | 63 |
| 5.- Mdm2 como sustrato de fosforilación de GRK2.....   | 64 |
| 5.1.- GRK2 fosforila a Mdm2.....   | 64 |
| DISCUSIÓN.....   | 67 |
| 1.- Mdm2 desempeña un papel clave en la degradación de GRK2.....   | 67 |
| 2.- Existen otras vías independientes de Mdm2 que modulan la degradación de GRK2....   | 68 |
| 3.- Modulación de la degradación de GRK2 por la vía de PI3K/ AKT/ Mdm2.....  | 69 |
| 4.- Implicación de GRK2 en procesos de migración celular.....  | 70 |
| 5.- Implicación de GRK2 en procesos de proliferación celular.....  | 71 |
| CONCLUSIONES.....  | 77 |
| BIBLIOGRAFÍA.....  | 78 |

## Abreviaturas.

|                 |  |
|-----------------|--|
| $\alpha$ ARs    | Receptores alfa adrenérgicos                                       |
| $\beta$ 1AR     | Receptor beta 1 adrenérgico  |
| $\beta$ 2AR     | Receptor beta 2 adrenérgico  |
| $\beta$ -arr    | $\beta$ -arrestina   |
| aa              | aminoácido   |
| AC              | Adenilato ciclasa  |
| ADN             | Ácido deoxiribonucleico  |
| ADP             | Adenosina 5' difosfato   |
| Adcontrol       | Adenovirus control   |
| AdsiRNA-GRK2    | Adenovirus siRNA GRK2  |
| ARN             | Ácido ribonucleico   |
| Arg             | Arginina   |
| AT              | Angiotensina   |
| ATP             | Adenosina trifosfato   |
| BSA             | Albúmina de suero bovino   |
| CHX             | cicloheximida  |
| DAG             | Diacilglicerol   |
| DMEM            | Medio de Eagle modificado por Dulbecco                             |
| DMSO            | Dimetilsulfóxido   |
| Dominios SH     | Dominios de unión a Src  |
| Dominios PDZ    | Dominios modulares de interacción entre proteínas                  |
| DTT             | Ditiotreitol   |
| EDTA            | Ácido etilén diamino tetraacético                                  |
| EGFR            | Receptor del factor de crecimiento epidérmico                      |
| EGTA            | Ácido etilenglicol-bis- $\beta$ -amino etil eter N,N' tetraacético |
| ENaC            | Canal de Na <sup>+</sup> de células epiteliales                    |
| ErbB            | Receptor tipo EGFR   |
| ERKs            | Quinasas reguladas por señales extracelulares                      |
| ET              | Endotelina   |
| FB              | Fibronectina   |
| FBS             | Suero fetal bovino   |
| FSK             | Forskolina   |
| G $\alpha$      | Subunidad alfa de las proteínas G                                  |
| G $\beta\gamma$ | Subunidades beta gama de las proteínas G                           |
| GAP             | Proteína estimuladora de la actividad GTPasa                       |
| GDP             | Guanosina difosfato  |
| GEF             | Factor intercambiador de nucleótidos de guanina                    |
| GIT             | proteína de interacción con GRKs                                   |
| Gly             | Glicina  |
| GPCR            | Receptores acoplados a proteínas G                                 |
| GRKs            | Quinasas de receptores acopladas a proteínas G                     |
| GRP             | Fosfatasa asociada a receptores acoplados a proteínas G            |
| GTP             | Guanosina 5' trifosfato  |
| GTPasa          | Actividad de hidrólisis del GTP                                    |
| HIF-a           | Factor inducible por hipoxia                                       |
| IGF-1           | Factor de crecimiento relacionado con insulina-1                   |
| IP              | Inmunoprecipitación  |
| IP3             | Inositol trifosfato  |
| Iso             | Isoproterenol  |
| Kda             | Kilodalton   |

|              |   |
|--------------|---|
| LMB          | Leptomycin B  |
| LPA          | Ácido lisofosfatídico   |
| MAPKs        | Quinasas activadas por mitógenos                              |
| MCRI         | Receptor de Melanocortina 1                                   |
| MDC          | Monodansilcadaverina  |
| MDM2         | Murine double minute 2  |
| MH1/2        | dominio de unión de Smads                                     |
| MKKs         | Quinasas de las MAPKs   |
| MKKKs        | Quinasas de las quinasas de MAPKs                             |
| MEKs         | Quinasas de las MAPKs   |
| PAGE         | Electroforesis en gel de poliacrilamida                       |
| PAK-1        | Quinasa activada por p21                                      |
| PBS          | Tampón fosfato salino   |
| PCR          | Reacción en cadena de la polimerasa                           |
| PDE4         | Fosfodiesterasa 4   |
| PDGF         | Factor de crecimiento derivado de plaquetas                   |
| PH           | Dominio de homología a plestrina                              |
| Pi           | Fosfato inorgánico  |
| PI3K         | Quinasa 3' de fosfatidil inositol                             |
| PIP2         | Fosfatidil-inositol-4,5-bisfosfato                            |
| PKA          | Proteína quinasa dependiente de AMPc                          |
| PKA cat.     | Subunidad catalítica de PKA                                   |
| PLB          | Fosfolipasa B   |
| PKC          | Proteína quinasa C  |
| PKI          | Péptido inhibidor de PKA                                      |
| PLC          | Fosfolipasa C   |
| PMSF         | Fenil metil sulfonyl fluoruro                                 |
| PP2          | 4-amino-5(4-cloro-fenil)-7-(t-butil)pirazol[3,4-d] pirimidina |
| PTX          | Toxina pertúsica  |
| RGS          | Reguladores de la señalización mediada por proteínas G        |
| RNAi         | Ácido ribonucleico mensajero                                  |
| RTKs         | Receptores con actividad tirosina quinasa                     |
| RyR          | Receptores de rianodina                                       |
| SDS          | Dodecil sulfato sódico  |
| SEM          | Error estándar de la media                                    |
| Ser          | Serina  |
| SmoR         | Receptor de Smoothed  |
| S1P          | Esfingosina-1-fosfato   |
| siRNA        | pequeño Ácido ribonucleico de interferencia                   |
| STI          | Inhibidor de la tripsina roja                                 |
| TAE          | Tris-acético EDTA   |
| TE           | Tris-EDTA   |
| TCA          | Ácido tricloroacético   |
| TEMED        | N,N,N',N'-tetrametil-etilen-diamina                           |
| Tris         | Tris-hidroxi-metil-amino-metano                               |
| TNF          | Factor necrótico de tumores                                   |
| TGF- $\beta$ | Factor transformador-beta                                     |
| Ub           | ubiquitina  |

G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and  $\beta$ -arrestins are key regulators of G protein-coupled receptors (GPCRs), a family of plasma membrane receptors involved in a variety of cellular and physiological processes, including cell migration, proliferation and survival. GRKs and arrestins promote GPCR uncoupling from G proteins upon agonist stimulation (desensitization) and receptor internalization. In addition, GRKs and arrestins can act as scaffold proteins, functionally interacting with a variety of signal transduction proteins, thus linking GPCR to new signalling pathways. GRK2, an ubiquitous member of the GRK family, displays an altered expression in several pathological conditions. However, the molecular mechanisms underlying such changes, and the functional consequences of altering GRK2 levels in different cell types are poorly understood. We had previously reported that GRK2 was rapidly degraded by the proteasome pathway upon GPCR stimulation, in a process dependent on  $\beta$ -arrestin function and involving GRK2 phosphorylation by different kinases.

In this work, we report the identification of Mdm2, an E3 ligase involved in the control of cell growth and survival, as a key player in GPCR degradation. Mdm2 and GRK2 associate upon GPCR stimulation in a  $\beta$ -arrestin-dependent manner. Increased Mdm2 expression accelerates GRK2 proteolysis and promotes kinase ubiquitination at defined residues, whereas GRK2 turnover is markedly impaired in Mdm2- deficient cells. In addition,  $\beta$ -arrestin recruitment to the receptor also promotes GRK2 degradation by the proteasome pathway in a Mdm2-independent manner, triggering the phosphorylation of GRK2 by c-Src and the subsequent recognition of the tyrosine-phosphorylated GRK2 by E3 ligases as Hakai.

Interestingly, we find that activation of the PI3K/AKT pathway by IGF-1 alters Mdm2-mediated GRK2 degradation, leading to enhanced GRK2 stability and increased kinase levels. Notably, increased GRK2 levels are detected in transformed vs. non-transformed breast cell lines, and in a proportion of breast cancer patients, particularly those showing increased AKT pathway activity. Finally, we report that GRK2 levels positively modulate the proliferation rate of the MCF-7 breast carcinoma cell line and the migration and invasion of breast cancer and melanoma cell lines towards key chemotactic signals. Overall, our data suggest that GRK2 plays a role in tumor progression and that inhibition of GRK2 expression could represent a novel therapeutic strategy in certain cancer types.

# INTRODUCCIÓN





potentes mitógenos como trombina, S1P, LPA, smoothened o endotelina regulan la proliferación en células tumorales y sus receptores se hallan sobreexpresados en varios tipos de cáncer (colon, mama, próstata, melanoma). Asimismo, receptores de quimioquinas como CXCR4 o CXCR2 desempeñan un papel central en la metástasis tumoral. Las células tumorales que sobreexpresan estos receptores son activadas por quimioquinas liberadas por células estromales, macrófagos y leucocitos infiltrados en el tumor, estimulando la motilidad y supervivencia de las células cancerosas.

Todos los GPCRs se organizan estructuralmente de modo similar, disponiéndose en siete hélices que atraviesan la membrana plasmática (denominados TM1 a TM7), unidas entre sí por tres bucles extracelulares (denominados e1, e2 y e3) y tres intracelulares, (i1, i2, i3). Su extremo N-terminal se sitúa en el exterior de la célula contribuyendo al reconocimiento de ligandos junto con los bucles extracelulares y, en algunos casos, dominios transmembrana. El extremo C-terminal se encuentra en la parte intracelular, participando en la interacción con las proteínas G heterotriméricas, junto al bucle i2 e i3 intracelular, así como en la unión de otras moléculas señalizadoras y proteínas "scaffold", que permiten transmitir las señales biológicas externas al interior de la célula (Baldwin, 1993). En función de la secuencia de los segmentos transmembrana, podemos clasificarlos en cinco subfamilias; de la Rodopsina (701 miembros), de adhesión (24 miembros), Frizzled/sabores (24 miembros), de glutamato (15 miembros) y de la familia de secretina (15 miembros) (Fredriksson, 2003). Las secuencias más conservadas entre todos los GPCRs se encuentran en los dominios transmembrana, adyacentes al segundo y tercer bucle intracelular por medio del cual interaccionan con las proteínas G, mientras que las regiones más variables son el extremo C-terminal, los bucles intracelulares que unen TM5 y TM6 y el extremo N-terminal, siendo éste último el más dispar de todos.

La mayoría de los receptores acoplados a proteínas G se activan tras la unión con su agonista, el cual provoca una serie de cambios conformacionales en el receptor capaces de promover su interacción con proteínas G, estimulando el intercambio de GDP por GTP lo que ocasiona la disociación en dos subunidades funcionales,  $G\alpha$ -GTP y  $G\beta\gamma$ . Algunos de estos receptores transmiten señales a través de la activación de más de un subtipo de las proteínas G, mostrando, por tanto, cierta promiscuidad y sugiriendo la existencia de diversos estados conformacionales tras la unión de ligandos (Kobilka, 2007). Existen numerosos mecanismos que modulan la funcio-

**T**odos los organismos han desarrollado complejos mecanismos de señalización para adaptarse al medio que les rodea así como para asegurarse la homeostasis de sus células. Los receptores GPCRs (del inglés, G-Protein Coupled Receptors) constituyen una familia de proteínas de la superficie celular encargadas de establecer contacto con el entorno y canalizar las señales externas al interior de la célula, originando los cambios necesarios para una mejor adaptación, supervivencia y proliferación. Los GPCRs, que se extienden evolutivamente a lo largo de tres de los cinco reinos vitales (Hongos, plantas y animales, (Horn, 1998)), representan más del 3% del genoma en vertebrados y hasta el 5% en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Bockaert, 1999). En el genoma humano la familia de GPCRs consta de más de 1000 miembros, de los cuales 460 aproximadamente pertenecen a los receptores olfativos y el resto responde a una amplia variedad de estímulos dispares como fotones e iones, pequeñas moléculas orgánicas, péptidos y proteínas.

Dado que estos receptores de membrana modulan procesos celulares básicos (diferenciación, migración, ciclo celular, respuestas antiapoptóticas) con frecuencia su actividad se halla involucrada en el origen y desarrollo de tumores de distinta naturaleza (Dorsam, 2007). Así,

nalidad de los GPCRs actuando sobre la síntesis del receptor, su tráfico intracelular y maduración o la estabilidad de la proteína. Entre los mecanismos dinámicos y reversibles que determinan el estado de activación de los GPCRs destacan los procesos de desensibilización o atenuación de la señalización de receptores tras la exposición crónica o aguda a estímulos. La desensibilización se inicia con la fosforilación del receptor en residuos del 2º y 3er bucle intracelulares y del extremo C-terminal por la acción bien de serina-treonina quinasas activadas por segundos mensajeros, clásicamente PKA y PKC, así como de tirosinas quinasas (desensibilización heteróloga), o bien por serina-treonina quinasas específicas o GRKs (del inglés, G- Protein Coupled Receptor Kinase) que reconocen selectivamente determinados estados conformacionales activos del receptor ocupado por ligando (desensibilización homóloga) (Carman, 1998; Claing, 2002; Marchese, 2003).

La fosforilación de los receptores por GRKs constituye una señal de reclutamiento para las proteínas  $\beta$ -arrestinas, moléculas adaptadoras que no sólo interrumpen la interacción del receptor con proteínas G, sino que también promueven su internalización o endocitosis mediante la interacción directa con las moléculas de la maquinaria endocítica clatrina y adaptatinas (Krupnick, 1997). Los receptores así internalizados son posteriormente dirigidos de nuevo a la membrana plasmática tras su defosforilación en endosomas (reciclaje o resensibilización) o marcados para su degradación lisosomal (fig 1). El complemento celular de GRKs y  $\beta$ -arrestinas desempeña un papel clave en la modulación funcional de los GPCRs, determinando no sólo la velocidad y extensión de los procesos de desensibilización y resensibilización, sino también la naturaleza de

las cascadas de señalización estimuladas por el receptor. En efecto, estas proteínas también dotan al receptor desensibilizado de nuevas capacidades de señalización al interactuar directamente con otras moléculas transductoras como c-Src, ERK1/2, PI3K, Ral GDS, etc (Bhattacharya, 2002; DeWire, 2007 ) (fig 1. punto 3).

Dado que la señalización de los receptores GPCRs en contextos tumorales exhibe frecuentemente cambios, bien como consecuencia de una amplificación en los niveles de expresión de los mismos, o bien como alteraciones en los mecanismos de regulación de su funcionalidad conducentes a una ganancia de función, es de interés general analizar los procesos que modulan a su vez la actividad de las moléculas reguladoras de estos receptores. En este contexto, el presente trabajo *tiene como objetivo identificar los procesos que modulan la estabilidad y funcionalidad de la proteína GRK2, uno de los miembros más ubicuos de la familia de GRKs, sus repercusiones en la fisiología celular y su participación en la transformación celular.*

### 1.- $\beta$ -arrestinas.

La fosforilación de receptores dependiente de GRKs, promueve la asociación de las proteínas  $\beta$ -arrestinas, las cuales no sólo participan en el desacoplamiento de las proteínas G, sino que permiten iniciar nuevas cascadas de señalización y regulan la actividad y estabilidad de otras proteínas, incluidas las propias GRKs.

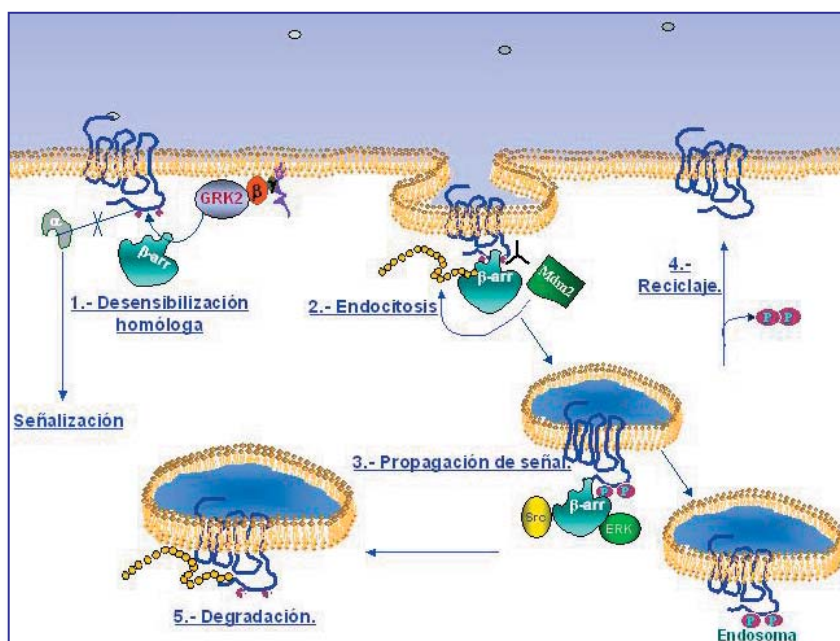


Figura 1: Esquema representativo del tráfico de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs).

- 1.- La desensibilización homóloga comienza con la fosforilación del receptor activado por las GRKs y concluye con el reclutamiento de  $\beta$ -arrestina, que desacopla al receptor de las proteínas G.
- 2.-  $\beta$ -arrestina interactúa con la maquinaria endocítica necesaria para llevar a cabo la internalización de receptores.
- 3.- La capacidad andamio de  $\beta$ -arrestina permite su acoplamiento con proteínas señalizadoras como c-Src y MAPK.
- 4.- El receptor defosforilado se recicla y se localiza de nuevo en la membrana plasmática.
- 5.- El receptor se degrada en lisosomas.

### 1.1.- Isoformas, estructura y función.

La familia de arrestinas consta de cuatro miembros, separados en dos subgrupos, las arrestinas visuales (arrestina 1 y 4) localizadas exclusivamente en retina (Kuhn, 1978) y cuya función queda restringida a la vía de fototransducción, y las arrestinas somáticas (no visuales) denominadas arrestina 2 y 3 o  $\beta$ -arrestina 1 y 2, expresadas en la mayoría de los tejidos. La isoforma  $\beta$ -arrestina 1 se localiza tanto en núcleo como en citosol, mientras que  $\beta$ -arrestina 2 se localiza principalmente en citosol. La aparente exclusión nuclear de  $\beta$ -arrestina 2 se debe a la presencia de una señal de exportación nuclear de la que carece la  $\beta$ -arrestina 1 (Scott, 2002). Ambas proteínas se translocan a la membrana plasmática tras la estimulación de receptores GPCRs y de algunos receptores RTKs como el IGF-1R, PDGFR o el receptor de la insulina (Girnit, 2005; Usui, 2004).

La secuencia aminoacídica de las dos isoformas de  $\beta$ -arrestinas muestra una homología del 78%, concentrándose la mayor divergencia en su extremo C-terminal. Estudios con animales que carecen de la expresión de estas proteínas han permitido identificar funciones celulares específicas de isoforma. Los animales que carecen de una de las isoformas son viables, mientras que la delección de ambas provoca la muerte en estado embrionario, sugiriendo que en cierta medida las funciones celulares de las  $\beta$ -arrestinas son redundantes y la falta de una de ellas se suple con la expresión de la restante (DeWire, 2007).

Las arrestinas fueron identificadas inicialmente como reguladores negativos de las señales mediadas por receptores de siete dominios transmembrana, por su participación con GRKs en la terminación del acoplamiento del receptor con las proteínas G y en el proceso de la internalización de receptores. Así, la interacción directa y de alta afinidad "in vitro" de clatrina con las isoformas de  $\beta$ -arrestina 1 y 2 (y no las visuales) permite la endocitosis de receptores  $\beta$ 2-AR y otros GPCRs por medio de vesículas de clatrina (Wolfe, 2007). La interacción con clatrina, proteína trimérica que forma agregados organizando estructuralmente las vesículas, se localiza en la mitad carboxilo terminal de las  $\beta$ -arrestinas. Asimismo,  $\beta$ -arrestinas interactúan con otros componentes de la maquinaria endocítica como la proteína AP-2, la cual parece ser crítica para dirigir a los receptores a las vesículas de clatrina, y con la proteína NSF. La interacción con AP-2 se caracterizó como directa e independiente de clatrina y se localizó en el extremo C-terminal (por

detrás del dominio de unión con clatrina) tanto en  $\beta$ -arrestina 1 como en  $\beta$ -arrestina 2. La interacción con NSF, (del inglés N-ethylmaleimida-sensitive fusion), proteína ATPasa esencial para la fusión de membrana (McDonald, 1999), potencia la internalización del  $\beta$ 2-AR, pero se desconoce la implicación funcional de esta interacción.

En base a la distinta afinidad en la asociación de los receptores con  $\beta$ -arrestinas y a su patrón de internalización y resensibilización se han definido dos tipos de receptores GPCRs (Shenoy, 2003). Los GPCRs de tipo A, como el  $\beta$ 2-adrenérgico, muestran baja afinidad por  $\beta$ -arrestinas, uniéndose de manera similar a ambas isoformas y disociándose rápidamente de ellas en el proceso de internalización. Por el contrario, los receptores de tipo B, como el de angiotensina o el de vasopresina, interactúan con las  $\beta$ -arrestinas con mayor afinidad, mostrando preferencia por  $\beta$ -arrestina 2, y permanecen asociados a estas moléculas durante la internalización, colocalizando en endosomas.

La unión estable de  $\beta$ -arrestinas al receptor tiene como consecuencia su retención en el compartimento endocítico y una menor velocidad de resensibilización. Asimismo, esta unión estable permite al receptor desensibilizado iniciar nuevas cascadas de señalización, gracias a la propiedad de  $\beta$ -arrestinas de interactuar con otras moléculas de señalización, como veremos más adelante. En relación a los factores responsables del tipo de unión entre GPCRs y  $\beta$ -arrestinas, se han propuesto tanto determinantes estructurales en el receptor, como modificaciones post-traduccionales en  $\beta$ -arrestinas. Así, los GPCRs de tipo B muestran en su extremo C-terminal una serie de repeticiones de serina no presentes en los receptores de tipo A que mediarían específicamente el reclutamiento de alta afinidad de  $\beta$ -arrestinas, una vez fosforilados por GRKs (Oakley, 1999). Por otro lado, el estado de ubiquitilación de  $\beta$ -arrestinas parece determinar las características de interacción de estas moléculas (Shenoy, 2003). De hecho, la modificación post-traduccionales de ubiquitilación aporta nuevas estructuras terciarias a la proteína sustrato, modificando conformacionalmente las proteínas y sus interfases de interacción proteína-proteína (Varadan, 2004).

La activación de receptores promueve la ubiquitilación de  $\beta$ -arrestina mediada por la ligasa Mdm2 (Shenoy, 2001). Se ha demostrado que esta modificación no sólo es necesaria para la internalización de receptores sino que también define la afinidad de interacción de  $\beta$ -arrestinas con los receptores. Así, la activación de receptores de tipo A promueve la ubiquitilación transitoria de  $\beta$ -arrestina, mientras que los de tipo B promue-



## INTRODUCCIÓN

ven una ubiquitilación sostenida. Apparently, the identity of the specific lysines that are ubiquitinated varies among the different receptors of type B, being the only relevant the stability of these modifications. De hecho, la fusión covalente de ubiquitina al extremo C-terminal de  $\beta$ -arrestinas modifica el patrón de resensibilización y señalización de receptores de tipo A a tipo B (Shenoy, SK, 2005).

Las  $\beta$ -arrestinas de mamíferos se localizan en el citoplasma como fosfoproteínas, que

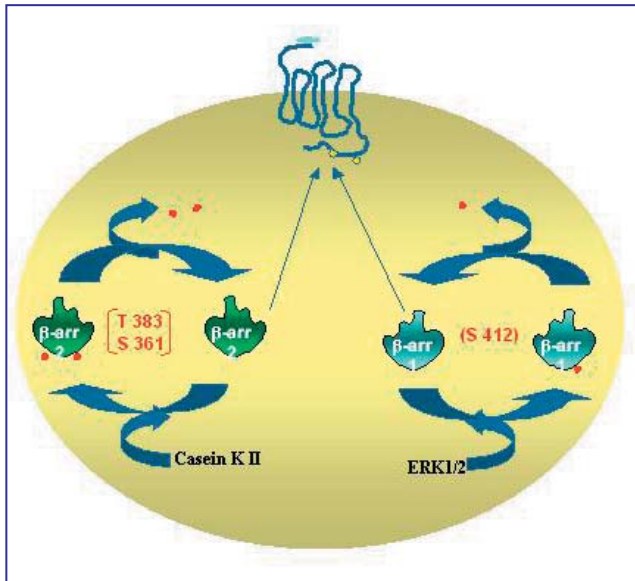


Figura II: Regulación de  $\beta$ -arrestinas por fosforilación.

Las proteínas  $\beta$ -arrestinas se encuentran en estado fosforilado en el citoplasma de la célula y requieren defosforilarse para el correcto acoplamiento con la maquinaria endocítica. La isoforma 1 se fosforila por la quinasa ERK1/2, mientras que  $\beta$ -arrestina-2 lo hace de manera dependiente de la caseína quinasa II.

se defosforilan tras la estimulación de receptores por agonistas.  $\beta$ -arrestina-1 se fosforila por la quinasa ERK en su serina 412, mientras que la fosforilación de  $\beta$ -arrestina-2 se lleva a cabo por la caseína quinasa II en la treonina 383 (You-Me, 2002) sufriendo una segunda fosforilación en la serina 361 de la cual se desconoce la quinasa responsable. La defosforilación de  $\beta$ -arrestinas en la membrana plasmática es un paso crítico para su unión a la maquinaria endocítica, pero no parece ser relevante en la unión con receptores y en la desensibilización. De hecho un mutante que mimetiza la fosforilación constitutiva de  $\beta$ -arrestina 1,  $\beta$ -arrestina-1 S412D, actúa como dominante negativo en procesos de internalización de receptores (Lin, 1997) (fig II).

### 1.2- $\beta$ -arrestinas como moléculas adaptadoras de vías de señalización.

Las  $\beta$ -arrestinas son moléculas que además de participar en la regulación de la desensibilización, internalización y reciclaje de GPCRs, actúan como moléculas adaptadoras que interaccionan con multitud de proteínas organizando espacio-temporalmente diversas cascadas de señalización. Así,  $\beta$ -arrestina desempeñaría una función clave en la activación de MAPK y PI3K y en la modulación de la actividad transcripcional de diversos factores nucleares.

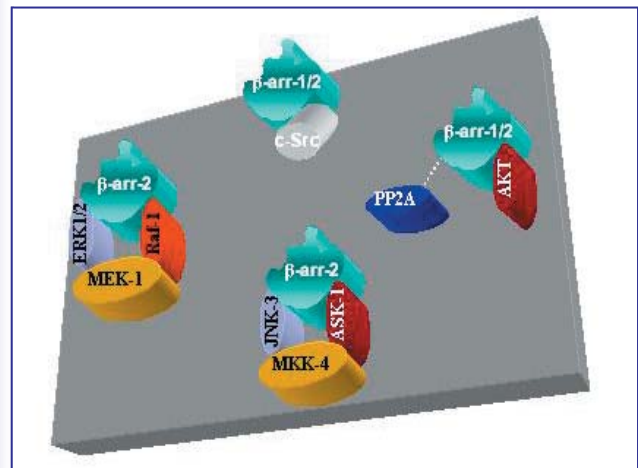


Figura III: Interactoma de  $\beta$ -arrestinas.

Esquema representativo de las interacciones directas o indirectas de  $\beta$ -arrestina con moléculas señalizadoras destacables en las cascadas de señalización de GPCRs.

### 1.3.- Regulación de MAPK.

Diversas evidencias indicaban que, en algunos contextos celulares, la internalización de GPCRs era esencial para la activación de MAPK promovida por estos receptores. Así, la expresión de mutantes dominantes negativos de dinamina y clatrina para la endocitosis de estos receptores bloqueaban la activación de ERK 1/2 (Luttrell, LM, 1997, Lin, FT, 1998).  $\beta$ -arrestina desempeñaba un papel clave en el acoplamiento de la internalización a las cascadas de activación de MAPK al interaccionar con la tirosina quinasa citosólica c-Src y promover su reclutamiento al receptor (Luttrell, 1999; DeFea, 2000; Miller, 2000).

Estudios posteriores demostraron que  $\beta$ -arrestina es capaz de reclutar directamente componentes específicos de los módulos de MAPK

como Raf1 y ERK 1/ 2 e indirectamente MEK1. La estimulación de GPCRs induce la formación de complejos en los que se encontraban asociados el receptor activado,  $\beta$ -arrestina 1, Raf1 y ERK fosforilado (DeFea, 2000). Por tanto, los GPCRs pueden activar ERKs por diversas vías, a través de proteínas G heterotriméricas y quinasas de segundos mensajeros de manera rápida y transitoria, y a través de  $\beta$ -arrestinas de manera más lenta y sostenida (Shenoy, 2005). Estas vías de activación de MAPK no sólo se diferencian en sus aspectos cinéticos, sino también en sus repercusiones funcionales, ya que la actividad ERK1/ 2 dependiente de  $\beta$ -arrestina se halla compartimentalizada en endosomas, lo cual restringe el acceso de ERK a sustratos nucleares y favorece el de sustratos citosólicos. De manera similar,  $\beta$ -arrestina organiza espacio-temporal-

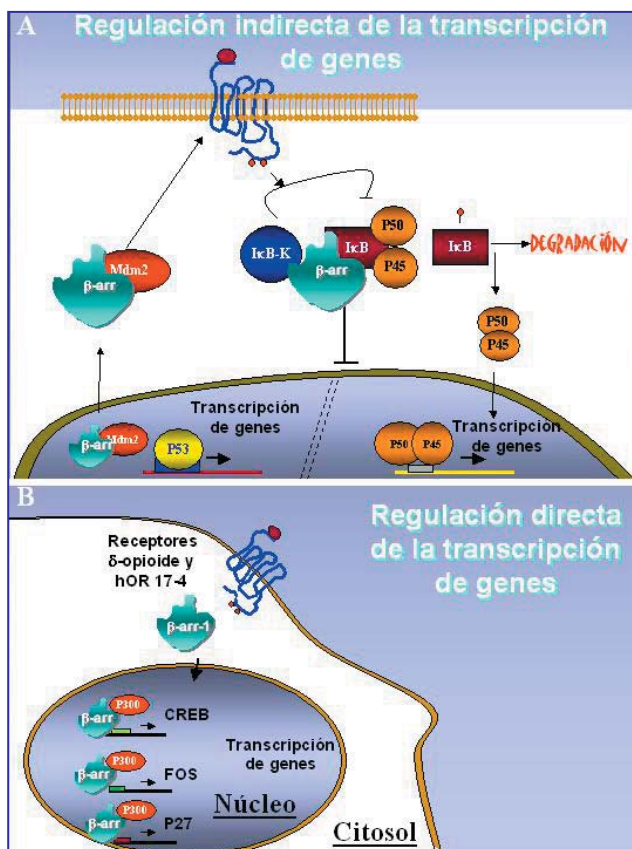
mente, tras la activación de receptores, la actividad de JNK por la quinasa ASK1 (McDonald, 2000; Miller, 2001).

La figura III muestra las diferentes cascadas de señalización mediadas por la condición de andamio de  $\beta$ -arrestina. Estas proteínas no sólo son importantes en la señalización de GPCRs, sino que también median funciones transductoras de señales para otros sistemas de receptores como el IGF-1R, contribuyendo a activar efectores claves como la proteína PI3K. Esta quinasa, que cataliza la fosforilación de fosfatidil inositol 4-5 bifosfato (PIP2) a fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfato (PIP3), estimula procesos celulares como la proliferación celular y promueve la inhibición de la apoptosis en respuesta a múltiples señales celulares, actuando a través de receptores tirosina quinasa y ciertos GPCRs. PIP2 y PIP3 actúan como señales de reclutamiento en la membrana para distintas proteínas con dominios PH entre las que se encuentran varios factores de intercambio de la GTPasa Rac, la quinasa PDK1 y la quinasa PKB o AKT (Missy, 1998; Vanhaesebroeck, 2000).

La activación de AKT requiere, además de la localización en membrana, de la fosforilación por PDK1 y una segunda quinasa (PDK2) para la que se han propuesto varios candidatos (Wymann, 2005). AKT regula diversas enzimas críticas en la división celular, como la proteína mTOR, los inhibidores p27 y p21, ciclina D1 ó los factores de transcripción de la familia forkhead, y reguladores apoptóticos como GSK3, caspasa 9, Bad o NF $\kappa$ B. Se ha demostrado que la activación de AKT dependiente de PI3K en respuesta a IGF-1 en fibroblastos, requiere la presencia de  $\beta$ -arrestina y es independiente de la actividad tirosina quinasa del receptor (Povsic, TJ, 2003).

Finalmente,  $\beta$ -arrestinas desempeñan otras funciones de regulación mediante su interacción con proteínas reguladoras de diversos factores transcripcionales en el citosol y en el núcleo. Así, la estimulación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, que promueve la asociación de  $\beta$ -arrestina con Mdm2 y su localización en membrana plasmática y endosomas, reduce la presencia nuclear de Mdm2 y su regulación sobre p53. Normalmente, la ligasa Mdm2 se concentra en núcleo, donde se asocia con p53 interfiriendo con su actividad transcripcional y promoviendo su ubiquitilación y degradación.

$\beta$ -arrestina además es capaz de interaccionar con el inhibidor de NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B, impidiendo su degradación por el proteasoma, en respuesta a la estimulación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Gao, 2004; Witherow, 2004). Asimismo,  $\beta$ -arrestina 1 y



**Figura IV: Regulación de la transcripción de genes de manera dependiente de  $\beta$ -arrestinas.**

**A)** La regulación indirecta de la transcripción deriva de la capacidad de  $\beta$ -arrestina para interaccionar con factores de transcripción y/ o con sus reguladores, afectando a su actividad o localización subcelular.

**B)** La regulación directa de la transcripción de genes de manera dependiente de  $\beta$ -arrestina implica su translocación a núcleo y localización en promotores específicos, permitiendo el reclutamiento de factores importantes en estos procesos como p300. Así,  $\beta$ -arrestina actuaría una vez más como molécula andamio pero en contextos nucleares y con factores muy distintos a los de la maquinaria endocítica.

2 co-inmunoprecipitan con diversas subunidades del complejo quinasa I $\kappa$ B, I $\kappa$ k  $\alpha$ ,  $\beta$  y I $\kappa$ B quinasa  $\alpha$  inducible (Witherow, 2004), responsable de la fosforilación de I $\kappa$ B que estimula su degradación. La presencia de  $\beta$ -arrestina impide la activación de este complejo quinasa y por tanto la transcripción dependiente de NF- $\kappa$ B (esquema en la figura IV panel A).

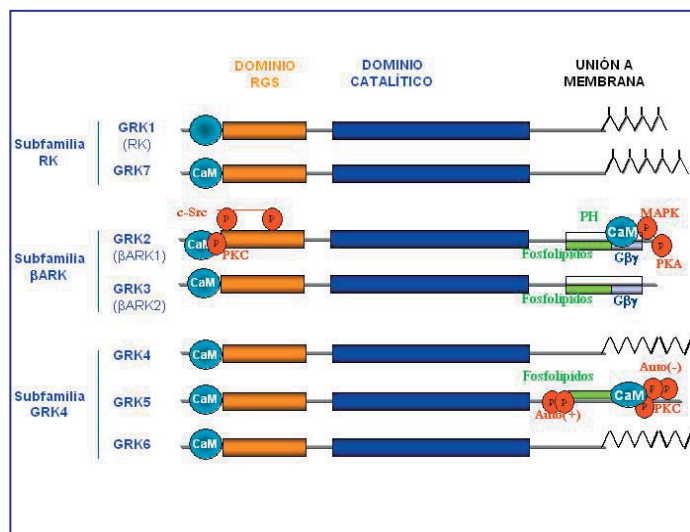
Recientemente se ha descrito la implicación de  $\beta$ -arrestina 1 en la transcripción de genes de manera más directa mediante su presencia en núcleo (Kang, 2005; Neuhaus, 2006) y su interacción con la proteína acetil transferasa de histonas, P300, que promueve la acetilación local de histona 4, modulando la transcripción de diversos genes. Así, se ha observado que la activación del receptor  $\delta$ -opioide induce la translocación al núcleo de  $\beta$ -arrestina 1 y su acumulación en el promotor de P27 (inhibidor de ciclinas quinasas) y c-fos (factor transcripcional), donde promovería el reclutamiento de P300 y la activación transcripcional de estos genes (esquema en la figura IV panel B).

## 2.- GRKs.

Las quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) constituyen una familia de siete miembros (GRK1-GRK7) que fosforilan residuos de serina/ treonina de receptores activados por agonista, promoviendo procesos de internalización, reciclaje y/o degradación de GPCRs en combinación con las  $\beta$ -arrestinas (fig V). Las proteínas GRKs poseen además otros sustratos de membrana no GPCRs, así como sustratos citosólicos que diversifican las consecuencias funcionales de la actividad de estas quinasas. Asimismo, se han identificado numerosas moléculas con las que las GRKs interactúan de modo independiente de la actividad quinasa (Pao, 2002; Ribas, 2007), lo cual pone de manifiesto la existencia de funciones "scaffold" para esta familia de proteínas. Dada la complejidad funcional de las GRKs y de su interactoma, estas proteínas están sometidas a una sofisticada regulación, tanto de sus niveles totales, como de su actividad y su localización subcelular. La identificación de las proteínas con las que interactúan las GRKs y sus mecanismos de modulación contribuirán a

identificar las funciones específicas desempeñadas por cada miembro de esta familia, la especificidad de estas quinasas frente a unos receptores concretos y la interrelación entre sus funciones señalizadoras frente a las desensibilizadoras (Kohout, 2003; Pao, 2002; Penela, 2003).

### 2.1.-Estructura, distribución y especificidad de sustrato.



**Figura V: Las quinasas de los receptores acoplados a proteínas G (GRKs).**

Las GRKs se agrupan en tres subfamilias: las GRKs visuales (1 y 7), la familia  $\beta$ ARK (2 y 3) y la familia GRK4 (4, 5, 6 y sus respectivas formas de procesamiento alternativo). Son proteínas multidominio: comparten un dominio catalítico central, y poseen dominios N- y C-terminal más variables, tanto en longitud como en función. En el N terminal se ubica un dominio de homología a proteínas RGS (RH), presente en todas ellas. El C-terminal contiene los determinantes de asociación con la membrana plasmática: unión covalente mediante modificaciones lipídicas o interacción con subunidades G $\beta\gamma$ . En la figura también se destacan otras regiones y fosforilaciones reguladoras. CaM, calcio-calmodulina, PH, dominio de homología a plekstrina, auto ( $\pm$ ), autofosforilaciones estimuladoras o inhibitoras.

Los siete miembros de la familia de GRKs que existen en metazoos comparten una similitud global en torno al 60-70%, y se agrupan por homología en tres subfamilias: Las GRKs visuales, presentes en bastones y conos (GRK1 o Rodopsina quinasa y GRK7, respectivamente), la familia de la quinasa del receptor  $\beta$ 2-AR (GRK2 y GRK3) y la genéricamente conocida como subfamilia de GRK4, que incluye a las isoformas GRK4, GRK5, GRK6 y a sus correspondientes isoformas de procesamiento alternativo, GRK6A, B y C y las cuatro variantes de GRK4 (Premont, 2007; Premont, 1999). Las quinasas no visuales son todas ubicuas, a excepción de GRK4, que se expresa de manera predominante en testículos y en menor medida en cerebro y riñón.

Las proteínas GRKs constan de un dominio central catalítico muy conservado, que varía de 263 a 266 aminoácidos, un extremo N-terminal de



183-188 residuos y un C- terminal más variable en extensión y en funcionalidad. Exceptuando a las GRKs visuales, todas las demás incluyen un dominio de homología a RGS N-terminal, que en el caso de GRK2/3 permite su interacción con proteínas G $\alpha$ q/11 (Carman, 1999). El dominio C-terminal contiene los determinantes necesarios para la correcta localización de estas proteínas. Así, GRK2 y 3 poseen un dominio de homología a plekstrina (PH), capaz de interaccionar con fosfolípidos de membrana, mientras que GRK5 presenta secuencias ricas en aminoácidos básicos en los extremos N y C- terminales de la proteína. GRK1, GRK4, GRK6 y GRK7 se hallan constitutivamente ancladas a la membrana plasmática mediante la modificación post-traducciona de cisteínas tioesterificables con palmitato o farnesilo. Las proteínas GRK2 y GRK3 se distribuyen en el citoplasma en condiciones basales, translocándose rápidamente a la membrana plasmática tras la estimulación de receptores. En este proceso es clave la interacción del dominio PH

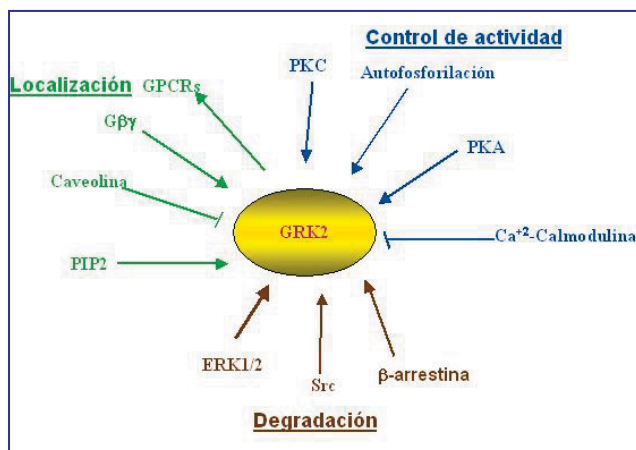


Figura VI: Mecanismos de regulación de GRK2.

Representación esquemática de los mecanismos que regulan la localización subcelular, la actividad y la vida media de GRK2. Tanto sustratos como proteínas estructurales modifican la actividad y la distribución de GRK2. Quinasas citosólicas regulan positiva y negativamente la actividad quinasas así como la velocidad de degradación.

con subunidades G $\beta$  $\gamma$  liberadas por los GPCRs activados, las cuales cooperan en la localización y activación de estas quinasas (ver esquema en la figura V).

La existencia de sólo siete GRKs para regular más de 1000 GPCRs plantea la necesidad de una cierta redundancia funcional entre las GRKs y la existencia de mecanismos que garanticen y dirijan la especificidad de estas quinasas por sus sustratos. La diferente distribución tisular de las GRKs permitiría definir, en parte, el repertorio de sustratos accesibles "in vivo". Así, GRK1 y 7 desensibilizarían receptores visuales, mientras que

GRK3, que exhibe un alto grado de expresión en el epitelio olfativo, modularía la actividad de los receptores de aromas. Sin embargo, la presencia simultánea de varias GRKs en un mismo órgano o tejido es frecuente y la especificidad de sustrato debe estar en estos casos determinada por otros mecanismos, tal y como sugieren las repercusiones funcionales derivadas de la manipulación selectiva de la expresión de ciertas GRKs. Así, ratones transgénicos como hemizigotos de GRK2 (la falta de expresión de esta quinasas causa letalidad embrionaria (Jaber, 1996)), muestran alteraciones en la señalización cardíaca de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos y no en la de los receptores de angiotensina, a pesar de que "in vitro" esta isoforma puede modular ambos sistemas de receptores. Por el contrario, GRK5 sí modula los receptores de angiotensina en corazón mientras que GRK3, a pesar de solapar su expresión en cardiomiocitos con la anterior quinasas, no modula ninguno de estos receptores esenciales en la fisiología cardiovascular (Iaccarino, 1998).

Por otro lado, incluso cuando se ha observado "in vivo" la fosforilación de un mismo receptor por varias GRKs, se ha podido constatar que las consecuencias funcionales en la regulación del receptor no son equivalentes. Así, mediante el uso de técnicas de siRNA interferente selectivo de diversas GRKs, se ha demostrado en sistemas celulares que la fosforilación de los receptores de angiotensina promovida por GRK2 o GRK3 modula la capacidad de internalización mediada por  $\beta$ -arrestinas de este receptor, mientras que la fosforilación del mismo por GRK5 o GRK6 sólo afecta a la capacidad de señalización a MAPK dependiente de  $\beta$ -arrestinas (Kim, 2005; Claing, 2002; Luttrell, 2002). Por tanto deben existir mecanismos que modulen la acción de las diferentes GRKs sobre un mismo sustrato receptor, en función de las necesidades de regulación de la célula (ver figura VI).

## 2.2.- Papeles funcionales de GRKs.

La diversidad de los sustratos de GRKs, y en particular de GRK2, que es la más ubicua y mejor caracterizada isoforma de la familia, revela un gran potencial fisiológico, ya que no sólo se modifican distintos GPCRs, sino también proteínas citosólicas implicadas en señalización de membrana y proteínas no GPCRs. Asimismo, GRK2 es capaz de modular diversas proteínas de manera independiente de fosforilación, sugiriendo que posee propiedades de proteína adaptadora o "scaffold" (fig VII).

### 2.2.1.- Fosforilación de sustratos no GPCRs

GRK2 es clave en la regulación de multitud de proteínas gracias a su actividad quinasa. GRK2 es capaz de fosforilar y regular la señalización de otros receptores de membrana distintos de los GPCRs, como EGFR y PDGFR- $\beta$ , frecuentemente asociados a procesos proliferativos patológicos como neoplasia tumoral, (Freedman, 2002; Hildreth, 2004; George, 2001).

GRK2 también posee la capacidad de regular activamente canales de  $\text{Na}^+$  (canal epitelial de  $\text{Na}^+$ , ENaC), no sólo a través de fosforilación directa de los mismos, sino potencialmente tam-

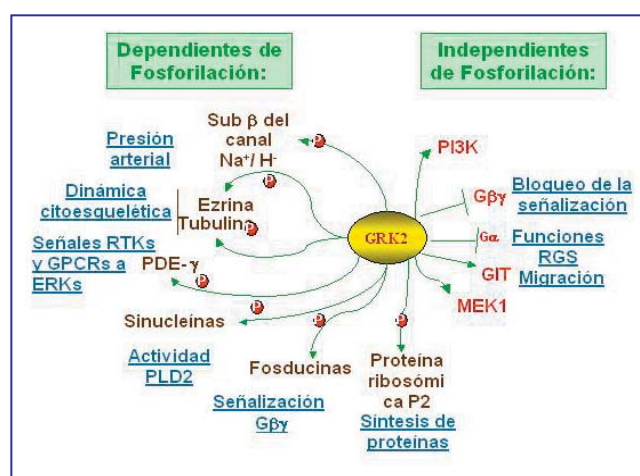


Figura VII: Funciones de GRK2.

Recientemente, se han descrito funciones adicionales a la fosforilación de GPCRs. Por un lado, la actividad quinasa de GRK2 sobre sustratos citosólicos modula diferentes procesos celulares. Por otro lado, nuevas funciones de GRK2 surgen debido a su capacidad para interactuar con multitud de proteínas, independientemente de su actividad quinasa.

bién a través de la modulación de la actividad de sus ligasas (Nedd2-4). La fosforilación de los canales bloquea su ubiquitilación y posterior internalización, manteniendo en estado activo al canal (Dinudom, 2004; Sanchez-Perez, 2007). GRK2 controla asimismo el transporte de  $\text{K}^+$  por medio de la fosforilación de DREAM (del inglés, Downstream regulatory element antagonist modulator), factor que en núcleo actúa como un represor transcripcional dependiente de  $\text{Ca}^{++}$  y que en citosol se asocia al canal Kv4 regulando la apertura y flujo de canales de  $\text{K}^+$ . La fosforilación de DREAM por GRK2 en la serina 95 bloquea la expresión de membrana de Kv4, sin afectar a la tetramerización del canal (Ruiz-Gomez, 2007).

GRK2 también se ha visto involucrada recientemente en procesos de resistencia a insulina al fosforilar el sustrato del receptor de insulina, IRS y aumentar su degradación (Usui, 2005). Igualmente, GRK2 participa en procesos de diferenciación de adipocitos mediante la fosforilación de p38 en la treonina 123. Este residuo se localiza en el "docking groove" y su modificación impide la interacción de p38 con activadores y sustratos. Esta modulación podría ser relevante en otros procesos celulares dependientes de p38, como inflamación o quimioresistencia tumoral (Peregrin, 2006). GRK2 también se perfila como un modulador clave de la señalización de TGF- $\beta$ , ya que fosforila los R-Smads, bloqueando su translocación al núcleo y por tanto inhibiendo la expresión de genes apoptóticos dependientes de TGF- $\beta$  (Ho, 2007; Ho, 2005). Por último, la proteína ezrina es asimismo sustrato de la actividad quinasa de GRK2 (Cant, 2005). La fosforilación de la treonina 567 es necesaria para que esta proteína adopte la conformación activa requerida para mediar la internalización de receptores y la reorganización del citoesqueleto,

### 2.2.2.- Regulación de otras proteínas de señalización independientemente de fosforilación.

Aparte de las funciones dependientes de la fosforilación descritas, las GRKs son proteínas multidominio capaces de interactuar con distintas proteínas, donde su actividad quinasa no parece ser necesaria. De esta forma GRK2 amplía su interactoma, interactuando con RKIP, PI3K, AKT, GIT, Clatrina, MEK1, o Hsp90, participando como molécula adaptadora en procesos de señalización y tráfico celular (Lorenz, 2003; Luo, 2003; Penela, 2003; Premont, 1998; Ribas, 2007; Jimenez-Sainz, 2006) (fig VII).

### 2.3.-Regulación de GRKs.

De lo anteriormente descrito, se deduce que el nivel de expresión y de actividad de GRK2 podría ser crítico en determinar la naturaleza, duración y extensión de respuestas celulares como supervivencia, motilidad o proliferación en las que están implicadas proteínas que constituyen su interactoma. En coherencia con este concepto, GRK2 exhibe sofisticados mecanismos que regulan su funcionalidad y expresión. En efecto, la estructura multidominio de las GRKs permite



su interacción con diversos componentes celulares, los cuales van a modular la actividad catalítica y la localización subcelular de estas proteínas. Dichas interacciones están sujetas a una activa regulación, con frecuencia específica para cada GRK, de tal modo que en respuesta a un mismo conjunto de señales, ciertas isoformas de GRKs se activan, mientras que otras pueden silenciarse. Asimismo, cada GRK posee un patrón propio de modificaciones post-traduccionales que regulan aspectos funcionales tan diversos como la actividad quinasa de estas proteínas, la estabilidad o la interacción con sustratos o proteínas reguladoras.

### 2.3.1.- Regulación mediada por proteínas y factores de interacción.

#### 2.3.1.1- Regulación alostérica de la actividad catalítica de GRK2 y GRK3 por Gβγ y lípidos.

En sentido amplio, las GRKs se pueden considerar quinasas dependientes de lípidos ya que todas interaccionan con fosfolípidos de membrana y dicha interacción se requiere para una óptima fosforilación de los GPCRs (Claing, 2002). Para la subfamilia GRK2/3 la unión de lípidos es especialmente relevante, ya que favorece su translocación a la membrana plasmática y la fosforilación de receptores activados. A través de los dominios PH de homología a plekstrina, estas quinasas interaccionan directamente con PIP2 y otros fosfolípidos ácidos presentes en las membranas celulares, los cuales, además, modulan la actividad quinasa. Así, la unión de fosfatidilserina (PS) y PIP2 incrementa entre dos y tres veces la fosforilación de receptores mediada por GRK2. Este efecto no sólo es debido al aumento de concentraciones locales de sustratos y quinasa en la membrana, sino también a efectos alostéricos inducidos por los lípidos. Así, PS aumenta también la fosforilación de sustratos solubles de GRK2.

En GRK2 y GRK3 el dominio de unión a plekstrina solapa con el de interacción con Gβγ. Esta interacción media también la localización a nivel de membrana de GRK2, dirigiendo la quinasa a los puntos de activación de receptores. La cooperación de lípidos y Gβγ en el reclutamiento de GRK2/3 a membrana es absolutamente necesaria "in vivo" para la adecuada desensibilización de receptores ya que ambos permiten vencer las numerosas interacciones que mantienen a GRK2 "silenciada" en otras localizaciones subcelulares

como veremos más adelante. La asociación de GRK2 a Gβγ requiere de la presencia de residuos hidrofóbicos localizados en la mitad del dominio PH (Arg 587) y en la hélice extendida (Lys 663, 665, 667) (Carman, 2000). Curiosamente, mutantes GRK2 R-587Q, que muestran defectos en su interacción con Gβγ, también exhiben defectos en la actividad quinasa. Ello es debido a que la unión de Gβγ promueve cambios conformacionales en la quinasa que se propagan al centro catalítico, activando alostéricamente la actividad enzimática. En efecto, la estructura cristalina de GRK2 revela que los dominios RGS, catalítico y PH se sitúan tridimensionalmente en los vértices de un triángulo estableciendo contactos entre sí, disponiéndose el dominio RGS como un eje transmisor de cambios alostéricos al dominio quinasa desde el dominio PH. En ausencia de lípidos o dímeros Gβγ, el centro catalítico se encuentra en una conformación inactiva o "abierta" similar a la de otras quinasas en estado basal (PKA, c-Src). La unión de Gβγ parece ordenar la región C-terminal del dominio PH y este cambio permite la unión cooperativa de los fosfolípidos. Como consecuencia de ello, modifica la interfase entre el dominio PH y el subdominio terminal del dominio RGS, transmitiéndose tal cambio al centro catalítico, en el cual los lóbulos mayor y menor se reorientan activando la quinasa (conformación cerrada) (Lodowski, 2005).

Recientemente se ha identificado un nuevo sitio de unión a Gβγ localizado en el extremo N-terminal de la quinasa que añade nuevas posibilidades a la regulación de GRK2 por Gβγ (Eichmann, 2003).

#### 2.3.2.- Regulación de la interacción con GPCRs y Gα.

El extremo N-terminal de las GRKs que precede al dominio RGS y que muestra menor conservación de secuencia, se ha implicado en la interacción con los GPCRs y en contactos con la membrana plasmática. De hecho, anticuerpos dirigidos contra los residuos 17-34 de la RK (Palczewski, 1993) impiden la fosforilación de rodopsina, mientras que la mutación/ delección de los residuos 30, 31, 32 de GRK2 reduce la co-localización de la quinasa con sustratos GPCRs (Palczewski, 1993). Por otro lado, el dominio de homología a RGS permite modular la actividad de la quinasa de modo alostérico y regular la actividad de GPCRs independientemente de la función quinasa.

El dominio RGS de GRK2 se organiza estructuralmente en un subdominio haz y un subdominio terminal que comprenden 9  $\alpha$ -hélices (aa 30-185). Sin embargo, a diferencia de otras RGS y en común con la proteína RGS atípica p115RhoGEF, el RGS de GRK2 consta de dos  $\alpha$ -hélices adicionales proporcionadas por la región C-terminal de la proteína (aa 513-547) que se pliegan hacia la región N-terminal. En consecuencia, el dominio RGS y el catalítico establecen numerosos contactos que se concentran en dos grandes interfases formadas por la hélice  $\alpha$ 10 del subdominio terminal RGS y los bucles de las láminas  $\beta$ 2- $\beta$ 3 y  $\beta$ 4 del lóbulo menor del centro activo de la quinasa, y por el bucle  $\alpha$ 4- $\alpha$ 5 (aa 98-103) del subdominio haz del RGS y la hélice  $\alpha$ J del lóbulo mayor del centro activo (Kozasa, 2001).

Estos contactos pueden modificarse como resultado de la interacción de proteínas con la región N-terminal de GRK2 o de modificaciones post-traduccionales en la misma. De hecho, la región RGS de GRK2 y 3 permite la interacción con las subunidades  $G\alpha_q$  en su estado activo y de transición, reduciendo la activación de su efector fosfolipasa C- $\beta$ , al bloquear la unión PLC $\beta$ - $G\alpha_q$ . Se ha propuesto que esta interacción podría modificar también la actividad de GRK2, de tal modo que la propia quinasa podría convertirse en un efector nuevo de  $G\alpha_q$  (Carman, 1999; Sallèse, 2000). Recientemente se han descrito los residuos críticos para la interacción de GRK2 con  $G\alpha_q$  (Sterne-Marr, 2003), los cuales no interfieren con la unión de otras proteínas RGS (RGS2,3 y RGS4) por lo que es posible la existencia de complejos ternarios. La habilidad de GRKs para interaccionar con GPCRs y las subunidades  $G\alpha_q$  no sólo ayuda al reclutamiento de GRKs a la membrana plasmática, sino que además representa un nuevo mecanismo para terminar eficientemente la señalización de GPCRs acoplados a  $G\alpha_q$ , al interferirse la asociación del receptor con las proteínas  $G\alpha_q$  de manera independiente de fosforilación (Pao, 2002).

El dominio RGS de los otros miembros de la familia GRK no es competente para interaccionar con  $G\alpha_q$  aunque no se puede descartar que modulen otras proteínas G diferentes (Kozasa, 2001).

### 2.3.3.- Regulación de GRKs por proteínas de unión con Calcio.

Los niveles intracelulares de calcio regu-

lan la actividad de las diferentes GRKs mediante la unión de proteínas sensibles a la concentración de este ión. La unión de la proteína recoverina, presente en células fotorreceptoras, inhibe específicamente a GRK1, permitiendo una regulación dinámica de la actividad de esta quinasa durante los ciclos de oscuridad (altos niveles de calcio) y luz (bajos niveles de calcio). Por su parte, la proteína calmodulina inhibe a las restantes GRKs (2-6) con diferente potencia. GRK5 es la más sensible a la acción de la calmodulina con un  $IC_{50}$   $\gg$  50nM, mientras que GRK2 presenta un  $IC_{50}$   $\gg$  2mM, lo cual exige concentraciones de calcio muy superiores a los valores fisiológicos habituales para obtener una inhibición apreciable (Sallèse, 2000). Aparte de la regulación de GRK2 por calcio-calmodulina, hay otras proteínas sensibles a calcio capaces de asociarse a esta quinasa y modular su actividad en rangos de concentración de calcio fisiológicos, como es el sensor neuronal de Calcio (NCS1) (Kabbani, 2002).

La interacción de GRK2 con calmodulina se localiza en los extremos N (aa 18-37) y C-terminal (aa 593-689) de la quinasa, de tal modo que se silencia la actividad catalítica de GRK2 como consecuencia bien de la interferencia con la unión de sustratos GPCRs, o bien de la inducción de cambios conformacionales alostéricos inhibitorios. En el caso de GRK5, el sitio de unión de calmodulina compite con el de unión de PIP2, bloqueando así la localización en membrana de GRK5. La presencia de calmodulina promueve además un patrón de autofosforilación distinto al que posee la quinasa unida a lípidos. En estas condiciones la fosforilación de receptores disminuye drásticamente, mientras que la de sustratos solubles podría aumentar. Coherentemente con este posible cambio en la preferencia de sustratos, GRK5 se localiza de manera regulada en el núcleo pudiendo modificar factores de transcripción u otras proteínas nucleares (Johnson, 2004). Por tanto, calcio-Calmodulina disminuiría preferentemente la actividad de GRK5 hacia receptores acoplados a la señalización de calcio sin afectar la capacidad de desensibilización de los mismos por GRK2.

### 2.3.4.- Regulación por caveolina.

En un principio se pensaba que GRK2 era una proteína citosólica soluble que interaccionaba transitoriamente con la membrana plasmática tras la estimulación de receptores. Su distribución subcelular es, sin embargo, más compleja, estando presente en otros compartimentos ce-

lulares, lo cual sugiere la existencia de diversos mecanismos moduladores del tráfico subcelular de GRK2. Se ha identificado una proporción significativa de GRK2 asociada a membranas microsomales por medio de la interacción de su extremo N-terminal (residuos 50-145) con factores proteicos. Cuando GRK2 está presente en los microsomas, se encuentra en un estado inactivo, pudiendo revertirse por la acción de activadores como las proteínas G heterotriméricas (García-Higuera, 1994; Murga, 1997). Curiosamente, también se ha demostrado la presencia de GRK2 en fracciones de membranas celulares ricas en caveolina, característica común a otras muchas proteínas de transducción de señales. Experimentos "in vitro" demuestran que la asociación de GRK2 a caveolina se lleva a cabo por medio de un dominio consenso de unión a caveolina en la región PH de GRKs (567-584) y en el extremo N-terminal (residuos 63-71), conservado en todas las GRKs. Esta región permite la asociación a caveolina de aquellas GRKs que carezcan de dominio PH. Aunque la unión de GRKs con caveolina inhibe fuertemente la actividad quinasas, el significado funcional aún se desconoce, pero se especula con la idea de que contribuiría a mantener atenuada la actividad de GRKs en condiciones basales (Carman, 1999).

GRK2 también se detecta asociada a vesículas de endosomas que se forman tras la activación de  $\beta$ 2-AR y otros receptores GPCRs, colocalizando con éstos durante la internalización (Ruiz-Gomez, 1997). GRK2 puede interaccionar directamente con clatrina mediante un motivo consenso de interacción con clatrina presente en la región C-terminal. La interacción con clatrina podría favorecer la colocación de GRK2 con algunos sustratos no GPCRs o facilitar su interacción con otras proteínas transductoras como MAPK de manera compartimentalizada (Jiménez-Sainz, 2006).

Por último, se ha visto que las GRKs son capaces de interaccionar con  $\alpha$ -actinina (Yi, 2002). Aunque el significado funcional de esta interacción se desconoce, es posible que a través de esta proteína GRK2 tenga acceso a potenciales sustratos relacionados con el citoesqueleto celular. Así, se ha demostrado que GRK2 fosforila y promueve el estado activo de ezrina (Cant, 2005), proteína esencial en la organización de estructuras corticales de actina, como "ruffles" y "filopodios," que interacciona con  $\alpha$ -actinina.

#### 2.4.-Regulación de la actividad de GRKs por modificaciones post-traduccionales.

Las GRKs son objeto de modificaciones post-traduccionales, como fosforilaciones, nitrosilación o ubiquitilación que modulan su actividad, localización y/o estabilidad.

##### 2.4.1.- Regulación de GRKs dependiente de quinasas de segundos mensajeros PKC y PKA

Las quinasas de segundos mensajeros PKC y PKA fosforilan a GRKs, modulando su actividad y su localización celular. Tanto GRK2 como GRK5 se fosforilan "in situ" e "in vitro" por PKC, pero difieren en sus consecuencias funcionales. PKC promueve la actividad de GRK2 frente a GPCRs, sin modificar la de sustratos solubles, mediante el incremento de la concentración de GRK2 en membrana. La fosforilación de PKC en la serina 29 de GRK2 no parece afectar a la actividad catalítica per se de GRK2. Dado que este residuo se halla en la región de interacción con calmodulina, es posible que la fosforilación por PKC libere una proporción de la quinasas citosólica de la inhibición por calmodulina, facilitando la asociación a GPCRs. Sin embargo, es más probable que la introducción de una carga negativa en la serina 29 induzca cambios conformacionales que aumenten la accesibilidad de los residuos N-terminales implicados en los contactos con la membrana plasmática (Krasel, 2001; Mandyam, 2002).

Contrariamente a lo que ocurre con GRK2, la fosforilación de GRK5 por PKC inhibe la actividad catalítica, tanto frente a GPCRs como a sustratos solubles. Existen dos posibles sitios de fosforilación en GRK5 localizados en su extremo C-terminal próximos a los sitios de autofosforilación inhibitoria inducidos por calmodulina. La región C-terminal de GRK5 define pues un dominio de autoinhibición modulado por fosforilación. La expresión celular diferencial de PKC, así como la de sus distintas isoformas y su activación por diferentes GPCRs acoplados a las distintas  $G\alpha$  determinarán el patrón de GRKs activas disponibles para mediar procesos de desensibilización, mediante la activación de GRK2 y la inhibición de GRK5 (Krasel, 2001).

La proteína quinasas dependiente de AMPc (PKA), activada por receptores acoplados a  $G_s$ , fosforila directamente a GRK2 promoviendo su actividad quinasas frente a receptores adrenérgicos. El sitio de fosforilación por PKA reside en la serina 685, próximo al dominio de unión a  $G\beta\gamma$ . La fosforilación por PKA no aumenta directamente la actividad catalítica de GRK2 sino que favorece su unión al dímero  $G\beta\gamma$ , el cual favorece

la localización en membrana de la quinasa y su activación alostérica. La regulación por PKA depende de la asociación de GRK2 a la proteína “scaffold” AKAP79, la cual organiza y compartimentaliza la interacción del receptor  $\beta$ -adrenérgico, PKA, GRK2 y fosfatasa (Cong, 2001). En este contexto, PKA regularía la desensibilización de receptores a varios niveles, mediante fosforilación directa de los mismos y mediante la potenciación de la actividad de GRK2 frente a los GPCRs.

### 2.4.2.- Regulación de GRKs dependiente de c-Src y MAPK.

La exposición a agonistas de GPCRs promueve, además de la activación de PKA y PKC, la estimulación de otras quinasas como c-Src y MAPK. c-Src fosforila directamente a GRK2 con gran afinidad en tirosinas de su extremo N-terminal (Y13, Y86, Y92) (Sarnago, 1999), identificadas mediante mutagénesis dirigida y ensayos de fosforilación “in vitro”. Este proceso es totalmente dependiente de la función adaptadora de  $\beta$ -arrestina, puesto que mutantes de la misma defectivos en unión a c-Src impiden la fosforilación de GRK2 (Penela, 2001). La modificación de estas tirosinas probablemente tiene consecuencias directas en la actividad catalítica, induciendo cambios alostéricos que aumentan la fosforilación tanto de GPCRs como de sustratos solubles. Estos residuos se localizan muy próximos al motivo “LET” en el bucle de las hélices 4 y 5 del dominio RGS que contacta con el centro catalítico. Asimismo, aparte de incrementarse la actividad catalítica de GRK2, se ha demostrado que la fosforilación de GRK2 por c-Src en el dominio RGS promueve la asociación con  $G\alpha_q$  (Mariggio, 2006) y la degradación de la quinasa por la vía del proteasoma (Penela, 2001) (véase apartado 2.5.3). Recientemente se ha descrito también la fosforilación de GRK2 por el receptor de tirosina quinasa PDGF- $\beta$  en sitios adicionales a los sitios de fosforilación por c-Src (Wu, 2005).

Por otro lado, se ha descrito la fosforilación de GRK2 por ERK1 mediante experimentos “in vitro” e “in situ”, en la serina 670 y la co-inmuno-precipitación de ambas proteínas en condiciones de activación de GPCRs. La modificación de este residuo localizado en el dominio de unión con  $G\beta\gamma$  reduce la asociación con estas subunidades y la actividad quinasa frente a receptores (Elorza, 2000). Por tanto, la activación de MAPK implica un mecanismo de regulación retrógrado negativo para la quinasa GRK2. Además, igual que en el caso de c-Src, la fosforilación por MAPK pro-

mueve la degradación de GRK2 por el complejo del proteasoma (véase apartado 2.5.3).

### 2.4.3.- Regulación por S-nitrosilación.

Los productos bioactivos NO y SNO son el resultado de la actividad de la proteína NOS (del inglés, Nitric Oxide Synthase), y controlan diversas cascadas de señalización, en parte por la modificación de proteínas sustratos con las que forman un enlace covalente en residuos de cisteínas internas, proceso denominado S-nitrosilación. Las cisteínas susceptibles a esta modificación post-traducciona l suelen localizarse próximos a dominios activos o alostéricos de las proteínas sustrato (Hess, 2005). Los agentes que promueven la generación de NO y SNO son inhibidores y potenciadores de las señales canalizadas a través de multitud de GPCRs, lo cual sugiere que ejercen una función relevante en la regulación de estos receptores.

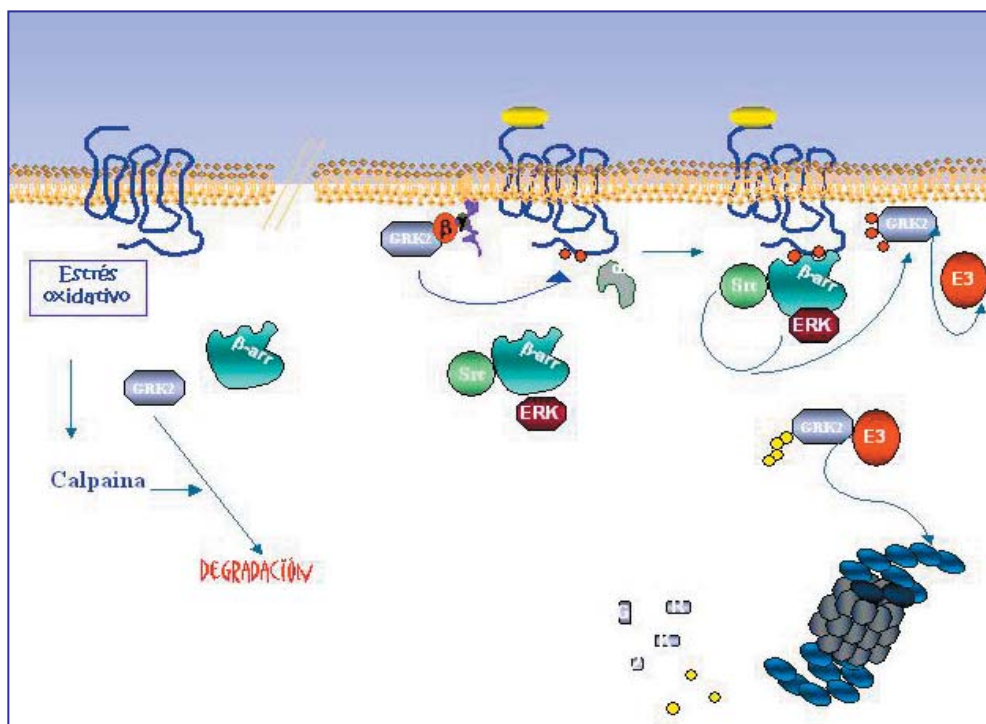
El uso de agentes nitrosilantes provoca efectos similares a los que causan la adición de inhibidores de GRK2 (Rockman, 1998) o el uso de siRNA específico de GRK2 (Violin, 2006). Recientemente, se ha identificado la S-nitrosilación de GRK2 en la cisteína 340, residuo crítico localizado en las proximidades del bucle activador del dominio catalítico, cuya modificación daría lugar a la inhibición de la actividad quinasa frente a receptores activados (Whalen, 2007).

### 2.5.- Regulación de los niveles de expresión de GRK2.

Los niveles totales de la proteína GRK2 que determinan el complemento celular de esta quinasa son el resultado del equilibrio entre los procesos que regulan su expresión génica y los que promueven su degradación proteolítica. Alteraciones en este equilibrio modifican los niveles de expresión de las distintas GRKs y con frecuencia estos cambios están asociados a diversas situaciones fisiopatológicas. Así, se han descrito alteraciones en la expresión de GRK2 en hipotiroidismo, isquemia, fallo cardíaco, fibrosis quística pulmonar, artritis reumatoide, así como en hipertensión ó adicción a opiáceos (Ammon-Treiber, 2005).

En algunas de estas situaciones, los niveles de GRKs se correlacionan positivamente con





**Figura VIII: Degradación de GRK2.**

La estabilidad de GRK2 está altamente regulada a muchos niveles y presenta dos vías de degradación, a través de las proteasas calpainas, en respuesta a estrés oxidativo y la vía del proteasoma, responsable de mantener los niveles de GRK2. La degradación de GRK2 por el proteasoma depende de la actividad quinasa frente a GPCRs, de  $\beta$ -arrestina como molécula adaptadora de proteínas críticas en la señalización de GRK2 a degradación, como c-Src y ERK 1/2, y de proteínas ligasas encargadas de ubiquitar a GRK2.

los niveles de mRNA, sugiriendo la existencia de mecanismos de regulación a nivel transcripcional responsables de la expresión de GRK2. No obstante, esta correlación está ausente en otras muchas, lo cual sugiere la participación de mecanismos post-transcripcionales que determinarán los niveles de GRK2, alterando bien la estabilidad de proteína (hipertensión, artritis reumatoide) (Lombardi, 1999), o bien la traducción de la proteína (estrés oxidativo) (Cobelens, 2007).

### 2.5.1.- Regulación a nivel transcripcional.

En la actualidad el conocimiento de los mecanismos que gobiernan la síntesis del mRNA de GRKs es escaso. La estructura del promotor de GRK2 es similar a la de genes típicos de mantenimiento ("housekeeping genes"), que muestran una actividad transcripcional constitutiva y una regulación poco activa (Penn, 1994). Sin embargo, el estudio de los perfiles de expresión de esta quinasa durante el desarrollo y en diversas situaciones fisiopatológicas sugiere la existencia de señales encargadas de promover cambios específicos en los niveles de mRNA.

Así, se ha establecido cierta correspondencia entre los niveles de GRKs y el estado funcional de GPCRs, de manera que la activación de estos receptores impulsa la transcripción de GRKs, aumentando los niveles de proteína, mientras que la presencia de antagonistas disminuye los niveles de mRNA y proteína. El aná-

lisis de la activación del promotor de GRK2 en células de músculo liso de aorta ha revelado que la actividad transcripcional de GRK2 está modulada por la activación de receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos, por la estimulación de  $G\alpha_q$  y por agentes que promueven la vasoconstricción e hipertrofia muscular como los ésteres de forbol. Por el contrario, citoquinas proinflamatorias, como IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$ , provocan el efecto opuesto en la regulación transcripcional de GRK2 (Ramos-Ruiz, 2000): Recientemente, se han identificado nuevas vías de señalización implicadas en regular la expresión génica de GRK2 específicas de tipo celular. La cascada de señalización dependiente de TGF- $\beta$  aumenta los niveles de expresión de GRK2 y mRNA en células epiteliales (Ho, 2005), mientras que la activación de linfocitos aumenta la transcripción de esta quinasa a través de los factores NFAT, AP1 y NF $\kappa$ B (Iñiguez, en preparación).

### 2.5.2.- Regulación de la expresión de GRK2 a nivel traduccional.

Recientemente, se ha descrito un nuevo mecanismo de regulación de los niveles de GRK2 a nivel traduccional. Los niveles de GRK2 detectados en reperusión tras tratamientos de hipoxia/isquemia en ratas se encuentran disminuidos sin mostrar cambios en los niveles de mRNA (Cobelens, 2007). Igualmente, las células de glioma de rata C6 tras la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentan nive-

les bajos de GRK2. Estos cambios en los niveles de GRK2 tras estrés oxidativo no se deben a cambios en la degradación de la proteína, sino a cambios en la traducción. Así, se ha descrito que la activación de calpaína y cdk1/2 por estrés oxidativo inhibe la traducción de GRK2. La quinasa de ciclinas cdk1 fosforilaría componentes de la maquinaria de traducción, silenciando de manera específica la traducción de GRK2 y por tanto, disminuyendo sus niveles (Cobelens, 2007).

### 2.5.3.- Regulación de la estabilidad de GRK2.

GRK2 es una proteína con una vida media corta, de aproximadamente una hora, cuya estabilidad se regula activamente, como ha demostrado nuestro grupo (Penela, 2003). El reciclaje de la quinasa se promueve tras la activación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, como el  $\beta$ 2-AR y CXCR4 en células Jurkat, dando lugar a cambios rápidos en los niveles intracelulares de la proteína. La regulación del recambio de GRK2 contribuye de manera importante al mantenimiento de los niveles estacionarios de esta quinasa. La degradación de GRK2 se lleva a cabo en general a través del complejo del proteasoma y requiere la poli-ubiquitilación de la quinasa como paso previo y limitante. En este contexto, la estimulación prolongada de GPCRs causa una regulación negativa de los niveles de GRK2, lo cual permite, en condiciones de desensibilización crónica, mantener una relación óptima entre receptores potencialmente activos y GRKs disponibles que garantice un mínimo de señalización. Una degradación defectiva de GRK2 potenciaría la desensibilización aberrante de receptores con consecuencias patológicas.

Los mecanismos de degradación de GRK2 muestran una gran versatilidad y complejidad, ya que el proteasoma no es la única proteasa capaz de modular el recambio de GRK2. Así, hemos demostrado que el estrés oxidativo inducido por exposición a  $H_2O_2$  en linfocitos disminuye en un 50% los niveles de GRK2, de manera dependiente de calcio y de la acción de la proteasa calpaína, sin observar diferencias en su mRNA (Lombardi, 2002) (fig VIII). La producción de especies reactivas de oxígeno se ha detectado en diferentes tipos celulares tratados con las citoquinas IL-6 e  $INF\gamma$ , que parecen ser señales críticas en la degradación de GRK2 por calpaína y en promover patologías como la artritis reumatoide, caracterizada por la disminución de los niveles de GRK2 y la hiper-reactividad de GPCRs sensibles a quimioquinas (Lombardi, 2002; Lombardi, 1999).

La degradación de GRK2 por el proteasoma es absolutamente dependiente de su actividad catalítica y del reclutamiento de  $\beta$ -arrestina, como demuestran la falta de degradación de un mutante inactivo de GRK2, GRK2-K220R, y el rescate de este proceso por la sobreexpresión de  $\beta$ -arrestina, la cual en estas condiciones es capaz de reclutarse a las inmediaciones del receptor, a pesar de carecer de señales de fosforilación (Penela, 2001). La capacidad de  $\beta$ -arrestina de promover la degradación de la quinasa salvaje y rescatar la del mutante GRK2-K220R parece implicar el reclutamiento de proteínas quinasas como c-Src y MAPK, que fosforilan a GRK2 en las tirosinas Y13, Y86 e Y92 y en la serina 670, respectivamente (Elorza, 2000; Penela, 2001; Sarnago, 1999). En consecuencia, la degradación de GRK2 se impide en presencia de mutantes de  $\beta$ -arrestina incapaces de asociarse a c-Src, por la adición de inhibidores de quinasas de tirosinas y de la cascada de MAPK y/ o mutantes inactivos de c-Src y de MEK (Elorza, 2003; Sarnago, 1999; Penela, 2001). La fosforilación de GRK2 por estas quinasas estimula el reciclaje de la quinasa por la vía del proteasoma, aumentando el grado de ubiquitilación de esta quinasa, probablemente por la acción de E3 ligasas específicas (fig VIII). Precisamente la identificación de estas ligasas es uno de los objetivos de esta memoria.

La clara participación de  $\beta$ -arrestina en la degradación de GRK2 y su interacción con nuevas proteínas, constituye un punto de partida para definir los mecanismos y ligasas implicados en el recambio de GRK2. Así, recientemente, se ha descrito la interacción de  $\beta$ -arrestina con Mdm2 (Strous, 2001; Wang, 2003), una E3 ligasa de la que hablaremos en detalle más adelante. Su participación en la internalización de receptores GPCRs y en ubiquitilación de  $\beta$ -arrestina y otras moléculas asociadas a los complejos de señalización de receptores, revelan a Mdm2 como una ligasa candidata para GRK2 especialmente atractiva.

### 3.- Degradación proteica por la vía del proteasoma.

La degradación proteica supone un último paso irreversible en los mecanismos de regulación responsable de la terminación de las señales y que es esencial para el correcto funcionamiento de la célula. Aunque existen numerosas proteasas involucradas en la degradación proteica, la vía del proteasoma ó UPS (del inglés, The Ubiquitin Proteasome System) es directamente

responsable de gran parte de la degradación alterada en la mayoría de las fisiopatologías. Esta vía proteolítica representa un proceso altamente regulado, específico y selectivo esencial para la homeostasis del metabolismo basal y en condiciones de estrés. La proteólisis catalizada por el proteasoma es un proceso que requiere, en la mayoría de los casos, la ubiquitilación previa de los sustratos de manera dependiente de la hidrólisis de ATP.

### 3.1.- Complejo del proteasoma.

La actividad catalítica se concentra en tres subunidades  $\beta$  ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 5$ ) exhibiendo propiedades proteolíticas tipo tripsina, quimiotripsina y caspasa. Las subunidades  $\beta$  catalíticas poseen una pro-secuencia que posteriormente se corta para dejar una treonina muy conservada expuesta en su N-terminal y esencial para la actividad proteolítica (Kisselev, 2000).

El complejo 19S se divide en dos estructuras, la base, por medio de la cual se une a las subunidades  $\alpha$ , encargada de desplegar los péptidos entrantes y de la apertura del poro, y la tapa, responsable de la de-ubiquitilación de los sustratos previa a su entrada al 20S (Glickman, 1998; Pickart, 2004; Voges, 1999). La hidrólisis de ATP se requiere tanto para la unión de los complejos 19 y 20 S, como para la de-ubiquitinación, el desplegamiento y el desplazamiento de los sustratos a largo del interior del proteasoma (Pickart, 2004).

La degradación por la vía del proteasoma tiene un amplio abanico de sustratos cuyo reconocimiento debe estar finamente regulado y adaptarse a las necesidades de la célula. Uno de los principales mecanismos por el cual la actividad del proteasoma adquiere especificidad y selectividad es la capacidad de esta proteasa para interaccionar con sustratos modificados por ubiquitina.

La ubiquitina, polipéptido de 76 aminoácidos que se expresa de manera ubicua en todas las células eucariotas, se conjuga a las proteínas y a algunas moléculas poliaminadas, bien como monómero, bien como oligómero de varias moléculas de ubiquitina (poli-ubiquitilación), mediante la formación de un enlace isopeptídico entre el grupo carboxilo del C-terminal de la ubiquitina y el grupo amino- $\epsilon$  de una lisina interna de la proteína sustrato o, menos frecuentemente, el grupo amino del aminoácido N-terminal de las proteínas (Weissman, 1997).

La ubiquitilación de las proteínas constituye una modificación post-traducciona reversible capaz de alterar las propiedades estructurales y funcionales de los sustratos de modo similar a otras modificaciones como fosforilación o acetilación.

Inicialmente, la ubiquitilación se identificó como una señal exclusiva de degradación. Sin embargo, la mono-ubiquitilación es necesaria para la internalización de numerosas proteínas y desempeña papeles críticos en procesos como la reparación del DNA o en la organización de cromatina (Ulrich, 2002; Pickart, 2002). La poli-ubiquitilación, además de modular la estabilidad de las proteínas (Pickart, 2004), participa en la regulación del tráfico subcelular (Hicke, 2003) y de la actividad de quinasas, factores de transcripción, etc (Sun, 2004).

La ubiquitina posee 7 lisinas en su secuencia aminoacídica susceptibles de unirse a otros monómeros de ubiquitina para generar cadenas de poli-ubiquitina estructuralmente diversas. Estas cadenas conjugadas originan señales diferentes en el sustrato. Así, se ha probado que cadenas de poli-ubiquitina en la K48 promueven la degradación por la vía del proteasoma, como también lo hace la poli-ubiquitilación en K29 (Chau, 1989; Koegl, 1999; Lindsten, 2002), mientras que las cadenas formadas vía K63 están relacionadas con la tolerancia al daño en el DNA (Ulrich, 2002), con la respuesta del sistema inmune (Sun, 2004), con el tráfico de proteínas (Hicke, 2003) o con la síntesis de proteínas ribosomales (Spence, 2000).

Las enzimas encargadas de catalizar la reacción de ubiquitilación son tres y actúan en cadena (Fig IX A). Las enzimas E1 o activadoras de ubiquitina, catalizan el primer paso del proceso formando un intermediario ubiquitina-adenilato. Las enzimas E2 o conjugadoras de ubiquitina se encargan de transferir la ubiquitina de la E1 a una cisteína propia del sitio catalítico. Las enzimas E2 conservan un dominio globular de aproximadamente 150 aminoácidos y algunas de ellas poseen largas extensiones en los extremos N y C-terminal que les confiere cierta especificidad para interaccionar con las E3 y con el sustrato, y determina su localización subcelular y su actividad. Finalmente, las enzimas E3 o Ligasas son las responsables de la transferencia última de la ubiquitina al sustrato. En la reacción de ubiquitilación, las E3 son las responsables de conferir la especificidad de sustrato. Representan la familia más numerosa de las enzimas de ubiquitilación, llegando a existir entre 500-1000 E3 distintas. Cada E3 actúa con una determinada E2, de las que se han identificado unas 20-30. Por tanto, las E2 participan en cierto grado en la regulación



## INTRODUCCIÓN

de la ubiquitilación, puesto que dependiendo de su disponibilidad, concentración y actividad condicionan la interacción con la enzima E3. Las enzimas E3 son estructuralmente diversas y se agrupan en tres subfamilias en función de la naturaleza de su dominio catalítico; Homologous E6AP C-terminus (HECT ligasas), Ufd2 Homologous Protein (U-box ligasas), y Really Interesting New Gene (RING ligasas).

La proteína que da nombre a la subfamilia de HECT ligasas E6-AP es la E3 ligasa que se asocia a la proteína viral (Papillomavirus) E6

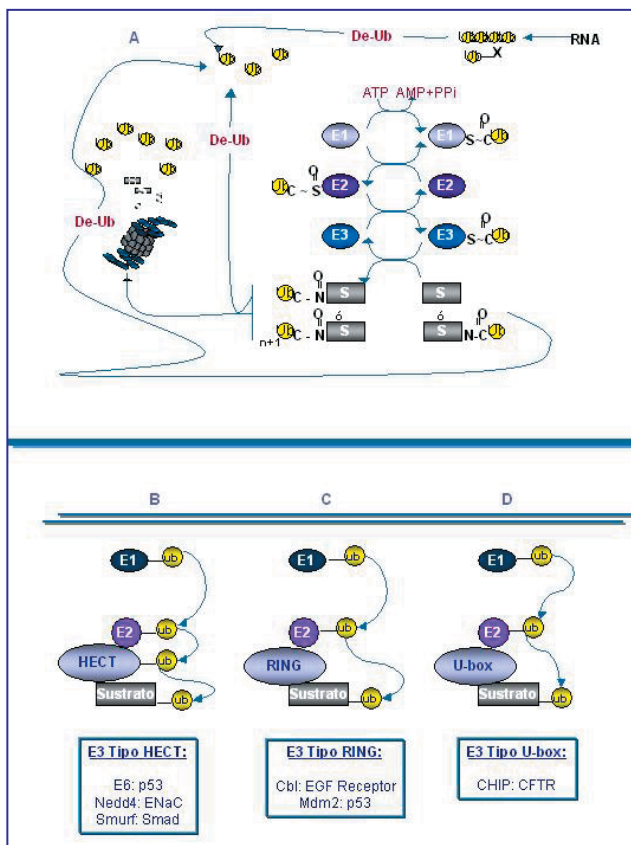


Figura IX: Reacción y enzimas que catalizan la ubiquitilación de sustratos.

**A)** Esquema representativo de la reacción de ubiquitilación, donde se muestra tanto la síntesis y reciclaje de ubiquitina, como los pasos críticos e intermedios de la ubiquitilación de sustratos mediante las enzimas E1 (activadora de ubiquitina), E2 (conjugadora de ubiquitina) y E3 (ligasa).

También se representan las diferentes familias de enzimas E3 ligasas y la manera de catalizar la ubiquitilación de sustratos. Así, las E3 de tipo HECT (**panel B**) son las únicas capaces de formar un intermediario tioéster con la ubiquitina antes de traspasarla al sustrato. Sin embargo, las E3 de tipo RING finger (**panel C**) y las U-box (**panel D**) median la ubiquitilación del sustrato por proximidad sin necesidad de reaccionar con la ubiquitina.

para promover la ubiquitilación aberrante de p53. De esta manera el virus cambia la especificidad de sustratos de la ligasa (cuyas dianas celulares se desconocen), para garantizar la evasión de apoptosis en la infección. Esta familia de ligasas tiene la particularidad de formar un intermediario tio-éster con la ubiquitina de manera dependiente de una cisteína altamente conservada localizada en su dominio catalítico (HECT) antes de transferirla al sustrato (Fig IX B). Todos los integrantes de esta familia poseen un dominio de aproximadamente 350 aminoácidos homólogo al C-terminal de E6AP y un dominio amino terminal C2 de interacción con fosfolípidos dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , responsable de determinar la distribución subcelular de estas ligasas, y varios dominios de interacción proteína-proteína "ww" que median el reconocimiento de sustrato, con frecuencia modulado por señales de fosforilación (Márchese, 2003). Estas ligasas están implicadas en la regulación de cascadas de señalización. AIP4 (Guirita, 2005), determina la internalización del receptor CXCR4, las ligasas Smurf 1/ 2 regulan el receptor TGF- $\beta$  y la estabilidad de las Smads reguladoras (Datto, 2005), y las ligasas Nedd4-1 los niveles de expresión y distribución de PTEN o la estabilidad del canal epitelial ENAC (Wang, 2007; Dinudom, 2004).

Las E3 ligasas de tipo RING son las más abundantes y las más versátiles estructuralmente. Contienen un dominio de 70-100 aminoácidos denominado RING finger con un octeto de cisteínas e histidinas que coordina 2 átomos de Zn. El espacio entre los dos metales es común en todas las proteínas de esta familia. Además, poseen una  $\alpha$ -hélice central, bucles de tamaño variable y varias láminas- $\beta$ . Estas ligasas no participan directamente en la catálisis de la ubiquitilación, dado que no forma ningún intermediario con la ubiquitina. Se ha propuesto que actúan como "scaffolds" facilitando la transferencia de la ubiquitina al posicionarse adecuadamente la lisina aceptora del sustrato con respecto a la E2. Asimismo, la unión del dominio RING al enzima E2 parece activar alostéricamente su capacidad de transtioesterificación (Fig IX B).

Dadas las dimensiones reducidas del dominio RING, estas proteínas han ido adquiriendo funciones diversas adicionales como ciertas actividades quinasa (ligasa MKK1), actividades ATPasas o dominios transmembrana.

El rápido reciclaje de GRK2 por ubiquitilación y por la vía del proteasoma sugiere que sea diana de una o varias de las ligasas pertenecientes a alguna de las familias mencionadas. De entre las ligasas RING multidominio destaca como posible candidato la proteína Mdm2, por su



reclutamiento a diversos receptores de membrana y su interacción con la proteína adaptadora  $\beta$ -arrestina (cofactor clásico de GRK2), lo cual podría contribuir a especificar la naturaleza de los sustratos de esta ligasa.

### 3.2.- Mdm2.

El gen *mdm2* se identificó a principios de los 90 como uno de los que se presentaban más de 50 veces sobreexpresados por amplificación en la línea celular espontáneamente transformada 3T3DM de ratones BALBs. Los genes *mdm* se localizan en pequeños cuerpos nucleares acentroméricos y extra-cromosómicos denominados “double minute”, que eran retenidos exclusivamente en las células cuando proporcionaban una ventaja proliferativa. Uno de sus productos, Mdm2 (del inglés, murine double minute 2), en condiciones de sobreexpresión era responsable de la transformación celular en células de ratón y de la inhibición de la transcripción mediada por el supresor de tumores p53 (Momand, 1992). Asimismo, el producto del gen homólogo en humanos, denominado Hdm2, se encontraba sobreexpresado en más de una tercera parte de los sarcomas humanos que conservaban p53 salvaje (Oliner, 1992).

Numerosos estudios han demostrado que Mdm2 es una de las principales E3 ligasas encargada de regular la estabilidad de p53, mediante la ubiquitilación de varias de sus lisinas (Nakamura, 2000; Rodríguez, 2000). Por tanto, Mdm2 regula la actividad de p53 a diferentes niveles, por un lado bloqueando su actividad transcripcional al unirse a través de la región N-terminal del dominio de transactivación de p53 y por otro lado, degradándola a través del dominio RING (Efeyan, 2007). A su vez, la expresión de la ligasa está sujeta al control transcripcional mediado por p53, por lo que Mdm2 y p53 forman parte de un mecanismo muy complejo de regulación retrógrada (Fang, 2000; Honda, 2000). Diversos experimentos “in vivo” demuestran que la expresión de Mdm2 es absolutamente necesaria para la viabilidad celular. Así, los ratones que carecen de Mdm2 mueren tempranamente en el estado embrionario y la viabilidad sólo se rescata con la delección completa de p53, poniéndose de manifiesto la estrecha interrelación de estas proteínas. Por otro lado, ratones con un alelo hipomórfico condicional en los que se consigue expresar sólo el 30% de la proteína, presentan menor peso, defectos hematopoyéticos y son más sensibles a la radiación (Mendrysa, 2003).

El gen murino y humano de Mdm2 posee 12 exones que generan multitud de proteínas y dos promotores capaces de generar otras dos proteínas p90KDa (entera) y p76KDa (generada a partir de un ATG interno), la cual pierde el dominio de unión a p53. La combinación de estos mecanismos genera en muchos tumores humanos y murinos un patrón complejo de expresión de isoformas de Mdm2, algunas de las cuales pueden actuar como dominantes negativos y activar a p53. Esta circunstancia, en la que coinciden simultáneamente niveles de p53 y Mdm2 aumentados en tumores, sugiere que la participación de Mdm2 en oncogénesis no se limita exclusivamente a la regulación de p53. En efecto, Mdm2 es una ligasa multidominio capaz de interactuar con muchas otras proteínas y regular su funcionalidad, incluso de manera independiente de ubiquitilación y de cambios en la estabilidad, lo que implica la participación de esta ligasa en multitud de cascadas de señales y funciones celulares dispares. Así, Mdm2 cooperaría en la transformación celular regulando la actividad de proteínas nucleares como p73, p63, p21, RB, P300/CBP, E2F, PCAF (Gu, 2001; Jin, 2003; Jin, 2002; Jin, 2004; Uchida, 2005) o proteínas citosólicas como HDAC,  $\beta$ -arrestinas y proteínas de membrana como el receptor IGF-1R (Guirrita, 2005) o E-caderina (Yang, 2006).

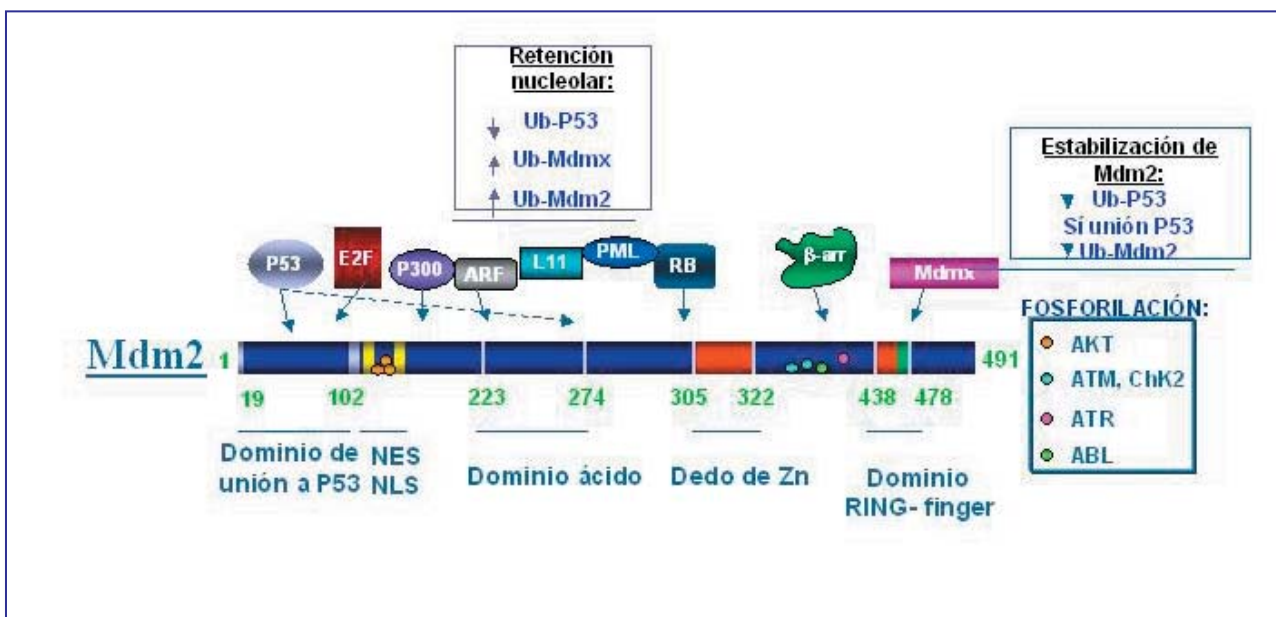
Coherentemente, la función de Mdm2 está finamente regulada, mostrando múltiples tipos de modificaciones post-traduccionales que afectan a diferentes parámetros. Como muchas otras ligasas, Mdm2 promueve su propia ubiquitilación, disminuyendo la estabilidad de la proteína (Lai, 2002), mientras la modificación por sumoilación tiene el efecto opuesto. Recientemente, se ha descrito la “neddilación” de Mdm2, modificación que inhibe la supresión transcripcional de p53 dependiente de Mdm2 (Xirodimas, 2004). Mdm2 posee en su secuencia numerosos sitios consenso de fosforilación por diferentes quinasas (fig X). Las quinasas de respuesta a daños en el DNA y de fallos en la replicación (ATM, ATR, Chk2 y c-abl) (Maya, 2001; Shinozaki, 2003; Chehab, 2000; Katayama, 2004) fosforilan a Mdm2 impidiendo su interacción con p53, lo cual previene su degradación y exportación al citosol. Por el contrario, la fosforilación de Mdm2 mediada por Akt en las serinas 166 y 186, promueve su translocación nuclear (Mayo, 2001) y la función ligasa frente a p53 (Ogawara, 2002).

Finalmente, la distribución subcelular de Mdm2 está fuertemente regulada y su alteración tiene consecuencias fisiológicas. Mdm2 se puede localizar en citosol, núcleo y nucleolo debido a secuencias intrínsecas de localización nuclear (NLS), de exportación nuclear (NES) y NoLS (de localización nucleolar). Asimismo, Mdm2 utiliza la

## INTRODUCCIÓN

interacción con multitud de proteínas para variar su localización subcelular y adaptarse así a las necesidades de la célula. De este modo, Mdm2 puede asociarse a 14ARF (19ARF en ratón) (Xirodimas, 2001; Efeyan, 2007), a PML (co-activador de p53) (Bernardi, 2004), a L11 (componente de la subunidad grande de ribosomas) (Bhat, 2004) y a nucleótidos (ATP/ GTP) (Poyurovsky, 2003) para localizarse en el nucleolo, lo cual promueve la estabilización y actividad de p53. Por otro lado, la asociación de Mdm2 a las proteínas adaptadoras  $\beta$ -arrestina 1 y 2 promueve su localización en el entorno de la membrana en las cercanías de receptores GPCRs activados (Shenoy,

2001) (Wang, 2003) y de receptores tirosina quinasa como el de IGF-1. Además, la asociación con la isoforma  $\beta$ -arrestina 2 promueve el tráfico de Mdm2 de núcleo a citosol (Wang, 2003), favoreciendo su acumulación en un estado silente para ciertos sustratos (Song, 2006 ).



**Figura X: Representación esquemática de la proteína E3 ligasa Mdm2.**

Mdm2 es una proteína multidominio capaz de interaccionar con diferentes proteínas sustrato y reguladoras de la localización subcelular, actividad y estabilidad de esta ligasa. El principal sustrato de Mdm2 es el gen supresor de tumores p53, con la que interacciona a través del dominio N-terminal de Mdm2. Posee dominios de localización nuclear (NLS) y exportación nuclear (NES) que determinan, junto con proteínas de interacción, la localización subcelular de Mdm2. Por otro lado, está sujeta a fosforilaciones activadoras e inhibitorias de su actividad catalítica frente a p53 como las llevadas a cabo por AKT y por quinasas de respuesta a estrés y daño en DNA, ATM, ATR y Chk2, respectivamente.



**OBJETIVOS**



- 1.- Identificar proteínas con actividad E3 ligasa responsables de la ubiquitilación de GRK2 y su degradación por la vía del proteasoma. Analizar el papel de la ligasa Mdm2 en la desestabilización de GRK2 promovida por la estimulación de receptores.
- 2.- Caracterizar el mecanismo de acción de  $\beta$ -arrestinas en la ubiquitilación y degradación de GRK2 dependiente de la activación de GPCRs y las repercusiones funcionales de la asociación de  $\beta$ -arrestinas con Mdm2 y otras ligasas.
- 3.- Identificar potenciales vías de señalización que modulen la actividad de Mdm2 y alteren la estabilidad de GRK2 en situaciones fisiopatológicas de interés caracterizadas por presentar cambios en los niveles de expresión de GRK2.
- 4.- Analizar las repercusiones funcionales de las variaciones en la estabilidad de GRK2 y en los niveles de expresión de la quinasa en procesos celulares de proliferación, migración e invasión en líneas celulares transformadas y no transformadas.

# MATERIALES Y MÉTODOS





proteínas de fusión (glutación-Sepharosa) se suministraron por Pharmacia-LKB.

La mezcla de marcaje metabólico [ $^{35}\text{S}$ ] metionina-cisteína fue suministrada por New England Nuclear.

El isótopo radiactivo [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP fue proporcionado por Amersham.

Se han utilizado además una serie de productos más específicos cuya procedencia se reseña en el texto.

## 2.- Cultivos celulares:

### 2.1.- Líneas celulares establecidas:

Se han utilizado diversas líneas celulares establecidas: las células HEK-293 EBNA (riñón embrionario humano transfectadas de manera estable con el vector EBNA) y las células HeLa fueron obtenidas de la ATCC (American Type Culture Collection), las células de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) de tipo salvaje, transgénicas doble knock-out de p53 y Mdm2 y knock-out para  $\beta$ -arrestina-1 y -2 fueron cedidas amablemente por el Dr. J. Moscat, la Dra G. Lozano (University of Texas, Huston, Tx) y el Dr. R.J. Lefkowitz (Duke University, Durham), respectivamente. Las células de epitelio de mama transformado MCF7 y MDA-MB-468 y la línea inmortalizada MCF-10A (de glándula mamaria humana) fueron proporcionadas por el Dr. Manuel Serrano (Centro Nacional de Investigaciones oncológicas, CNIO). Las células B16F10 de melanoma de ratón fueron suministradas por la Dra. Marta Izquierdo (Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", CBMSO). Por último, las células Hs578T de carcinoma ductal de mama fueron cedidas por el laboratorio del Dr. José M. Cuezva (Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa").

Las células MCF-10A se crecieron en medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) al 50% con medio Ham's nutrient mixture F-12 (Gibco) suplementado con glutamina 2mM, Suero fetal de caballo al 5%, una mezcla de antibióticos (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  gentamicina, 0,01% estreptomicina y 0,063% penicilina G), EGF (20ng/ml, collaborative research), Insulina (Sigma, 10mg/ml), hidrocortisona (500ng/ml) y Toxina colérica (Calbiochem, 100ng/ml).

Las células restantes se crecieron en monocapa sobre placas P35, P60 y P100 (Falcon) en medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con glutamina 2mM, suero fetal de ternera al 10%, y una mezcla de antibióticos (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  gentamicina, 0,01% estreptomicina y

## 1.- Materiales:

Todos los reactivos y productos utilizados son de grado analítico. Cloruros sódico, cálcico, amónico, manganésico y magnésico, fosfatos sódicos y potásicos, carbonatos sódicos, hidróxido sódico, acetato sódico, sacarosa, urea, Tris, formaldehído, glicina, ácido acético glacial, ácido clorhídrico, metanol, etanol, butanol y glicerol fueron suministrados por Merck.

ATP, fluoruro sódico, ácido deoxicólico, Ácido etilén diamino tetraacético (EDTA), ácido etilenglicol-bis- $\beta$ -amino etil eter N, N'tetraacético (EGTA),  $\beta$ -mercaptoetanol, DTT, heparina, ortovanadato sódico, dimetilsulfóxido (DMSO), rojo Ponceau, HEPES, Nonidet P-40, Tritón x-100, Tween-20, aprotinina, inhibidor de tripsina, azida sódica, Proteína-A Sepharosa, fueron suministrados por Sigma.

Fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF), benzamidina, leupeptina, pepstatina, inhibidor de tripsina de soja (STI), IPTG, glutatión reducido y BSA se obtuvieron de Boehringer Mannheim.

N,N,N',N'-tetrametil-etilen-diamina (TEMED), Dodecilsulfato sódico (SDS), persulfato amónico, azul de bromofenol, azul de Coomassie, patrones de peso molecular conocido, papel de nitrocelulosa, reactivo de Bradford fueron proporcionados por Bio-Rad. El reactivo de Folin-Ciocalteu se obtuvo de Panreac, el TCA de Carlo-Erba. Las resinas para la purificación de

0,063% penicilina G). Todos estos tipos celulares se incuban a 37°C en una atmósfera humidificada con 7% de CO<sub>2</sub>.

## 2.2.- Plásmidos utilizados:

El vector vacío PcDNA3 procede de invitrogen.

Los vectores PcDNA3-GRK2-S670D y PcDNA3-GRK2-S670A, generados por la Dra. Ana Elorza y el PcDNA3-GRK2 K19/21/30/31R por la Dra. Petronila Penela.

Asimismo, las construcciones PcDNA3-GRK2-Y13/86/92F generada por la Dra. Susana Sarnago y PcDNA3-GRK2-Y13/86D generada por la Dra. Catalina Ribas se realizaron también en nuestro laboratorio.

Las construcciones PcDNA3-GRK2 y PcDNA3-GRK2-K220R bovinos fueron cedidas por el Dr. J. L. Benovic (universidad Thomas Jefferson, Philadelphia).

El plásmido PcDNA3-SF  $\beta$ 2-AR HT del receptor  $\beta$ 2-Adrenérgico, unido al epítipo signal-flag (SF) y con una cola de histidinas (HT, del inglés "histidine-tagged") para facilitar su inmunoprecipitación y purificación, fue cedido por la Dra. Ana Ruiz-Gómez (Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Madrid)

Los cDNAs de  $\beta$ -arrestina-1 y  $\beta$ -arrestina-2 bovinas fueron cedidos por el Dr. S. Gurevich (Sun Health Research Institute) y se subclonaron en nuestro laboratorio en PcDNA3+Higro usando los sitios de restricción Not 1 y Apa 1. Los mutantes  $\beta$ -arrestina-1S412D y S412A fueron donados por el Dr. R. J. Lefkowitz (Duke university, Durham) mientras que el cDNA de  $\beta$ -arrestina-1 V53D fue cedido por el laboratorio del Dr. M. G. Caron de la misma universidad.

El plásmido de HA-ubiquitina se construyó como se detalla en Penela y cols. 1998.

Los plásmidos de AKT y AKTmyr fueron cedidos por la Dra. Cristina Murga (CBMSO)

El plásmido pCMdm2 fue cedido por el Dr. Manuel Serrano, y los mutantes S168A, S188A y S168/188A por el laboratorio del Dr. L. Mayo (Case School of Medicine, Cleveland), mientras que los mutantes de Mdm2 S168/188D, S168D y S188D se cedieron por el Dr. Mien-Chie Hung (MD Anderson Cancer Centre, Houston, TX)

Los siRNA-GRK2 humano y de ratón fueron generados por Helena Holguín e Ivette Aymerich,

respectivamente, en nuestro laboratorio.

## 2.3.-Transfecciones:

Las transfecciones transitorias de las células HEK-293 se llevaron a cabo en placas P100 ó P60 a una confluencia de entre el 70 y el 80%, con Lipofectamina. Resumidamente, se incuban las células a 37°C en medio OPTIMEM (5ml que contienen 5-10 $\mu$ g de DNA por P100 ó 3-5 $\mu$ g por P60) con 8ml de Lipofectamina comercial por cada mg de DNA.

Para las transfecciones en células MCF-7 y MCF-10A, se utilizó el reactivo Eugene HD en una relación 6:2 (reactivo: DNA). Las células MEFs se transfectaron con FUGENE 6 en relación 3:2 (reactivo: DNA).

En cada experimento y para todos los tipos celulares se añade la cantidad de vector vacío necesaria para mantener la cantidad total de DNA



**Figura MM-1: Selección de células por el método de dynabeads.**

Esquema representativo del método de selección de células transfectadas con el cDNA CD-8 junto al cDNA de interés.

**A)** Representación esquemática del reconocimiento antígeno (receptor CD-8 expresado en la superficie celular) anticuerpo (anti-CD8 acoplado a la sefarosa imantada), requerido para la selección de células transfectadas.

**B y C)** Fotografía del instrumental utilizado para la selección exclusiva de células acopladas a las dinabeads imantadas mediante un imán-gradilla de tubo falcon (15ml).

**D)** Fotografía de células MCF-7 transfectadas transitoriamente tras media hora de incubación con dinabeads.

por placa constante. Tras 5 horas de incubación a 37° C en el medio de transfección, se añade medio DMEM suplementado con suero al 20% para obtener así una concentración final de suero del 10%. Al día siguiente, se reemplaza el medio con DMEM más 10% suero y se deja que las células se recuperen al menos durante 24 horas antes de procesar el cultivo para el experimento.

La expresión transitoria de las distintas proteínas se confirmó por análisis de los lisados totales mediante inmunodetección tras electroforesis ("inmunoblot") con anticuerpos específicos como se explica en el apartado 6.1.

#### 2.4.- Infección de células con Adenovirus:

La disminución de la expresión de GRK2 endógeno en las células MCF7, HS578T y B16F10 se llevó a cabo mediante infección con el adenovirus- siRNA-GRK2 humano y de ratón, respectivamente a MOI 100 en Optimem y 2% suero. Como control negativo de la infección se utilizó el adenovirus control siRNA-lámina γ humano. A las 8-12 horas se cambia el medio de infección por DMEM, 10% FBS y a las 48 horas las células se procesan para realizar el experimento indicado en cada caso.

#### 3.-Selección de células transfectadas con el método Dynabeads:

Las células MCF-7 y MCF-10A se co-transfectaron con el plásmido del receptor CD-8 y las construcciones de interés. A las 24 horas de la transfección las células se incuban en medio de cultivo con una solución de "dynabeads" 50 µg/ml específicas del CD8 (Dyna), bolas magnéticas recubiertas con un anticuerpo que específicamente reconoce al receptor CD-8 expresado en la membrana plasmática. La incubación procede durante 30 minutos y a 4 °C para que el anticuerpo se una al receptor sin llegar a internalizar. Se realizan tres lavados con PBS 1x a 4° C y seguidamente se procede a levantar las células con tripsina. Las células positivas se seleccionan con un imán durante 5 minutos. Se desecha el medio y las células unidas al imán se resuspenden en DMEM 10% FCS para su posterior siembra en placa P35 ó p60 según el número de células obtenidas (fig MM-1).

A las 48 horas de la transfección procedemos a realizar el experimento pertinente con las células seleccionadas.

#### 4.- Marcaje metabólico con [<sup>35</sup>S]-metionina. Experimentos de "pulso y caza":

Las células crecidas hasta un 80% de con-

fluencia en placas P60, se incuban durante 2 horas en su medio habitual libre de metionina, cisteína y suero. Posteriormente se reemplaza éste añadiendo 0,5ml de DMEM libre de metionina suplementado con 0,5mCi/ml de [<sup>35</sup>S]-Protein Labeling Mix (NEN) y se incuban 15 minutos a 37°C y 7% de CO<sub>2</sub> ("pulso"). Tras el marcaje, las células se lavan con PBS y se incuban en medio de cultivo normal (DMEM más 10% FCS) durante los tiempos indicados ("caza"). Finalmente, las células se lisan y las proteínas de interés se inmunoprecipitan tal y como se especifica en la sección 6.2.

#### 5.-Tratamientos celulares:

Los tratamientos de estimulación o inhibición de las células transfectadas transitoriamente se llevaron a cabo en todos los casos tras 48 horas de la transfección. Posteriormente se recogieron las células en tampón fosfato salino (PBS) frío, en ocasiones suplementado con ortovanadato sódico 1mM, para su posterior lisis.

##### 5.1.-Estimulación con isoproterenol:

La estimulación con isoproterenol (Sigma) de células HEK-293, MCF7 y MDA-MB-468 a una concentración final de 10µM se llevó a cabo a 37°C en medio de cultivo suplementado con HEPES 20mM (pH 7.5) y 1mM ácido ascórbico (Sigma). Para algunos procedimientos experimentales se mantuvieron las células en ausencia de suero durante un tiempo de entre 90 min y 18 horas previos a la estimulación, según se detalla en los pies de figura.

##### 5.2.- Tratamiento con Betaxolol:

El tratamiento con el antagonista inverso betaxolol (cedido amablemente por Synthelabo) en células HEK-293 EBNA a una concentración final de 1µM se llevó a cabo a las 48 horas de la transfección a 37°C en DMEM sin suero.

##### 5.3.- Tratamiento con IGF-1:

Las células MCF7 y las células MDA-MB 468, que expresan receptores de IGF-1 endógenos, se estimularon con 50ng/ml de IGF-1 (SIGMA) durante diferentes periodos en DMEM/ 0,1% suero tras previa incubación en medio de cultivo suplementado con 0,1% suero durante una noche.

Para hacer los experimentos de "time course" (activación dependiente del tiempo o curso temporal) se usó la misma concentración de IGF-1 en DMEM utilizando como control DMEM 0,1% BSA para mantener la concentración de proteína



en el medio.

#### 5.4.-Tratamiento con LY294002:

LY294002 (Calbiochem) es un inhibidor específico de la proteína fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K). Células MCF7 y MEFs p53/ Mdm2 KO se preincubaron durante 30 minutos con el inhibidor a una concentración final de 10 $\mu$ M, manteniéndose posteriormente durante los tiempos indicados en presencia de IGF-1 ó placebo.

#### 5.5.- Tratamiento con ML-9:

ML-9 (Alexis Biotechnology) es un inhibidor específico de la quinasa AKT. Se utilizó previa a la adición de los estímulos indicados, manteniéndose posteriormente durante los tiempos indicados en el texto en las células MCF7, MDA-MB-468 y MCF10A. Se preincubaron durante 30 minutos con ML-9 a una concentración final de 50 $\mu$ M.

#### 5.6.- Tratamiento con cicloheximida:

Cicloheximida (CHX, Calbiochem) se añadió a los cultivos celulares a una concentración final de 18 $\mu$ M 1-2 horas antes de los tratamientos indicados con objeto de inhibir la síntesis proteica.

#### 5.7.-Tratamiento con Leptomicina B:

La Leptomicina B (SIGMA) bloquea la exportación al citosol de proteínas nucleares cuyo tráfico depende de la actividad del factor CRM1. Las células se preincubaron con el inhibidor durante 90 minutos manteniéndose posteriormente en el ensayo de pulso y caza (células HEK-293) o bien se incubaron durante los tiempos indicados en presencia de 10% suero para su posterior lisis (células MCF7) a una concentración final de 5ng/ml.

#### 6.-Fraccionamiento celular:

Células HEK-293 se transfectaron con la forma salvaje de GRK2 o con el mutante de GRK2-K19,20,30,31R. Las células se lisaron con un tampón hipotónico (Tris-HCl 25mM pH 7.5, EDTA 2mM, ortovanadato 1mM, fluoruro sódico 5mM, inhibidores de proteasas). Los lisados se centrifugaron a 800xg, durante 5 minutos y el sobrenadante se volvió a centrifugar a alta velocidad (250,000xg durante 45 minutos) para obtener la fracción citosólica (S) y la fracción que contiene las membranas (P). Las fracciones se resolvieron en un gel SDS-PAGE y se detectó la proteína GRK2 con un anticuerpo específico. Las fracciones citosólicas de células que sobreexpresan la forma salvaje de GRK2 o la forma mutante de GRK2-K19,20,30,31R se sometieron

a ensayos de fosforilación “in vitro” usando segmentos externos de Rodopsina purificada como sustrato como ya han descrito anteriormente (Murga, 1996). Como control positivo se usó la quinasa recombinante purificada.

#### 7.-Electroforesis:

##### 7.1.-Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS:

Se utilizaron geles de poliacrilamida-SDS según el método descrito por Laemmli en 1970, cuyos porcentajes de acrilamida-bisacrilamida oscilaban entre 7 y 12% en función de la resolución requerida por el experimento. Como patrones de peso molecular se emplearon las proteínas miosina (200 KDa),  $\beta$ -galactosidasa (116,25 KDa), fosforilasa B (97,4 KDa), albúmina de suero bovino (66,2 KDa), ovoalbúmina (45 KDa), anhidrasa carbónica (31 KDa), inhibidor de tripsina de soja (21 KDa) y lisozima (14 KDa) (Bio-Rad) . En algunos casos, los geles se tiñeron con azul de Coomassie siguiendo el protocolo descrito por Harlow y Lane (1988).

Tras resolver las proteínas, el gel puede someterse a autorradiografía o a fluorografía si las proteínas están marcadas con [<sup>35</sup>S]-metionina, mediante la fijación del gel en metanol:acético (50:10) durante 20min y posterior incubación durante 20minutos con el reactivo Amplify (Amersham). Tras la deshidratación al vacío se expone autográficamente usando una película de rayos X Agfa Curix RP2 de 100 NIF.

##### 7.2.-Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa-TAE:

La separación de fragmentos de DNA se realizó en geles de agarosa de desarrollo horizontal del 0,8-1% agarosa. El tampón de electroforesis utilizado es TAE (Tris-acético 40mM, EDTA 2mM) y el tampón de carga de las muestras fue glicerol al 50%, EDTA 1mM, azul de bromofenol al 0,4% y azul de xileno al 0,4%. Los patrones de peso molecular fueron los fragmentos de digestión enzimática con HindIII de los fagos  $\lambda$  y  $\phi$ 29 (suministrados por el servicio de fermentación del Centro de Biología Molecular).

#### 8.-Inmunodetección, inmunoprecipitación e inmunofluorescencia:

##### 8.1.-Inmunodetección tras electroforesis (“Immunoblot”):

Las muestras para el análisis (proteínas purificadas, lisados o fracciones subcelulares) se resuelven en geles de poliacrilamida-SDS junto

con patrones de peso molecular comerciales (Bio-Rad). Las proteínas así separadas se transfieren a un filtro de nitrocelulosa (Transblot de Bio-Rad) mediante transferencia líquida en tampón carbonato pH 10 durante 75min. a 50 V (Trans-Blot Cell de Bio-Rad). Tras teñir la membrana de nitrocelulosa con rojo Ponceau, se incuba toda la noche a 4°C en medio TBS (Tris-HCl 10mM pH7,5, NaCl 150mM) suplementado con leche en polvo desnatada (Molico) al 5%, con objeto de bloquear los posibles sitios de unión inespecífica. Posteriormente, la membrana se incuba con el anticuerpo primario correspondiente diluido en TBS-Molico 1% durante 3 horas a temperatura ambiente o 12 horas a 4°C. Tras efectuar lavados de la membrana con TBS-Tween 20 al 0,15 % se procede con la incubación del segundo anticuerpo (anti-inmunoglobulina de conejo unido a peroxidasa, cuando el 1er anticuerpo es policlonal, y anti-inmunoglobulina de ratón si es monoclonal; ambos de Nordic Immunology) diluido 1:50.000. Finalmente, para el revelado se emplea un método quimioluminiscente en que la peroxidasa cataliza la oxidación del sustrato luminol en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ECL, Amersham). La cuantificación se realiza por densitometría láser (Molecular Dynamics 300A Computing Densitometer).

## 8.2.-Inmunoprecipitación:

Las células se lisan en tampón RIPA (NaCl 150mM, Tris-HCl 20mM pH 7,5, Nonidet P-40 1%, ácido deoxicólico 0,5%, y SDS 0,1%), en presencia de un cocktail de inhibidores de proteasas, durante 90min a 4°C con agitación permanente. El solubilizado celular se clarifica por centrifugación durante 15min. a 12.000rpm. Al sobrenadante suplementado con BSA 0,8% se le añade el anticuerpo a la dilución necesaria. Se permite la

formación de complejos antígeno-anticuerpo durante 16 horas a 4°C para su posterior incubación con 100µl de proteína A-agarosa (Sigma) al 50% durante 90min a 4°C. Se recogen los complejos inmunes por centrifugación (4min. a 12.000rpm) y, tras descartar el sobrenadante, se lavan 5 veces (800xg, 5min.) con 10ml de tampón RIPA. Las proteínas inmunoprecipitadas se resuspenden en un tampón de ruptura reductor de electroforesis, excepto las inmunoprecipitadas de ubiquitina que se resuspenden en un tampón no reductor suplementado con N-Etilmaleimida. Tras hervir las muestras durante 5min, éstas se resuelven en un gel de poliacrilamida-SDS del porcentaje adecuado.

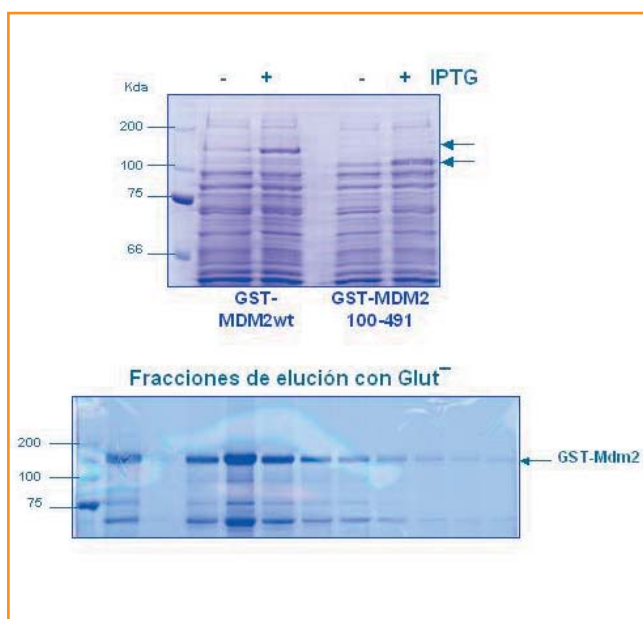
La inmunoprecipitación de proteínas ubiquitiladas se llevó a cabo lisando las células en el tampón Tris-HCl 20mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 0,1mM, NaCl 100mM, tritón X100 1%, Deoxicolato 0,5%, N-etilmaleimida 5mM, permitiendo la formación de complejos antígeno anticuerpo durante tres horas a 4°C.

Para la inmunoprecipitación de la ligasa Mdm2 las células se lisan en un tampón Tris-HCl 20mM pH 7,5, NaCl 100mM, NP40 0,5%, glicerol 10%, EDTA 1mM suplementado con inhibidores de proteasas.

Tras electroforesis de las muestras, el gel se transfiere a una membrana de nitrocelulosa para revelar las proteínas mediante inmunomarcado tras electroforesis como se describe en la sección 6.1. Si las proteínas están marcadas con [<sup>35</sup>S]-metionina, se somete el gel a fluorografía y posterior exposición autorradiográfica.

## 8.3.-Anticuerpos utilizados:

Con el fin de analizar la cantidad o presencia de algunas proteínas concretas en nuestras fracciones de tejido o celulares, se utilizaron los anticuerpos indicados en la página siguiente.



**Figura MM-2: Purificación de la proteína de fusión GST-Mdm2.**

Se muestran geles representativos de la purificación de la proteína GST-Mdm2. El panel superior muestra con dos flechas las bandas teñidas con Coomassie correspondientes a la proteína GST-Mdm2 salvaje y la mutante GST-Mdm2 100-491, a 120 KDa y 100 KDa aproximadamente, que aparecen únicamente tras la estimulación con IPTG.

El gel inferior muestra las distintas fracciones de las eluciones de la proteína GST-Mdm2 salvaje con glutatión reducido.



| Nombre           | Epítipo                            | Origen                   | Concentración   | Monoclonal policlonal | Utilidad |
|------------------|------------------------------------|--------------------------|-----------------|-----------------------|----------|
| PF1              | 50-145 aa<br>N-term GRK2<br>bovina | Nuestro laboratorio      | 1:1000<br>1:300 | Policlonal            | IP<br>IB |
| PF2              | (436-689 aa)<br>GRK2               | Nuestro laboratorio      | 1:600           | Policlonal            | IB       |
| C15              | GRK2C-terminal                     | Santa Cruz Biotechnology | 1:500           | Policlonal            | IB       |
| GRK2/3<br>c5/1.1 | (467-688 aa)<br>GRK2/3             | Upstate                  | 1µg/ml          | monoclonal            | IP       |
| SMP14            | 154-167 aa<br>Mdm2                 | Santa Cruz Biotechnology | 1:500           | monoclonal            | IP       |
| N20              | N-terminal<br>Mdm2                 | Santa Cruz Biotechnology | 1:500           | policlonal            | IB       |
| Ab186            | 172-268 aa<br>β-arr 1 bovina       | Nuestro laboratorio      | 1:600           | Policlonal            | IB       |
| C-18             | β-arr 2                            | Santa Cruz Biotechnology | 1:5000          | policlonal            | IB       |
| 12CA5            | (YPYDVDPY)<br>de HA                | Boehringer Mannheim      | 0,8µg/ml        | monoclonal            | IP       |
| Y-11             | HA-Probe                           | Santa Cruz Biotechnology | 1:500           | policlonal            | IB       |
| GFP (B-2)        | 1-238 aa de<br>GFP                 | Santa Cruz Biotechnology | 2µg/ml<br>1:500 | monoclonal            | IP<br>IB |
| Anti-UB          |                                    | SIGMA                    | 1:100           | policlonal            | IB       |
| FK1              | Poliubiquitina                     | Affinity                 | 1:1000          | Policlonal            | IB       |
| FK2              | Mono y poliubiquitinas             | Affinity                 | 1:1000          | monoclonal            | IP<br>IB |
| Actina (I-19)    | C-term actina humana               | Santa Cruz Biotechnology | 1:600           | Policlonal            | IB       |
| P-AKT            | Ser 473                            | Cell Signalling          | 1:1000          | policlonal            | IB       |
| AKT              | C-terminal de Akt1, Akt2 y Akt3    | Cell Signalling          | 1:1000          | policlonal            | IB       |
| FLAG             | Flag                               | Affinity Bioreagents     | 1µg/ml          | policlonal            | IB       |

### 9.- Purificación de la proteína de fusión GST-Mdm2 y mutantes:

Las bacterias competentes BL21 transformadas con el plásmido de GST-Mdm2 se crecen durante la noche a 37° C en medio LB con ampicilina 100µg/ml. Pasadas 24 horas se diluye el medio de cultivo 1/5 y se deja crecer 1 hora 30 minutos a 37°C con agitación. Seguidamente se estimula la síntesis de la proteína de fusión con la adición al medio de IPTG 1mM durante 3 horas a 25° C.

Posteriormente, se centrifuga el medio de cultivo a 6000 g durante 15 minutos a 4° C y se desecha el sobrenadante. De aquí en adelante todo se realiza a 4° C para minimizar la lisis proteica. El precipitado de células se lisa en Urea 8M, glicina PH 9, 0,1M con una mezcla de inhibidores de proteasas y lisozima 2mg/ml durante 20 minutos a 4° C. Se practican tres ciclos de congelación descongelación del lisado y se sonica. Para reducir la presencia de DNA se incuba el solubilizado con Dnasa 100µg/ml.

Se dializa en tripas de diálisis de 25mm frente a un tampón glicina PH9 10mM durante una noche. Una vez eliminada la urea, la muestra se diluye hasta un volumen de 60ml con PBS 1X, Tritón x100 0,1% y se centrifuga 20 minutos a 20 000xg. El sobrenadante se incuba con glutatió-

sepharosa (previamente lavada y equilibrada con PBS 1X, tritón x 100 0,1% y cocktail de inhibidores) en noria durante tres horas. Seguidamente las proteínas unidas inespecíficamente a la resina, se eliminan mediante lavado de la resina con PBS 1X, tritón x100 0,1%. La elución de las proteínas de fusión GST se lleva a cabo en presencia de un gradiente discontinuo de glutatión reducido (concentraciones de 0,5mM, 10mM y 20mM) con tres medios de elución, preparados en Tris-HCl PH 8,5 1M, recogiendo fracciones de 1ml.

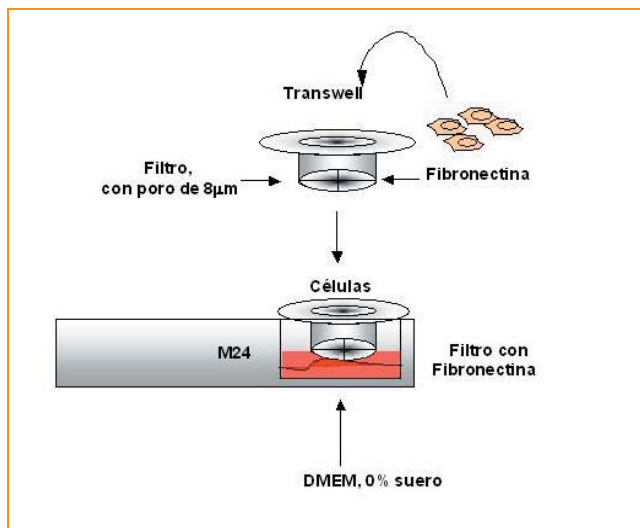
Se comprueba la pureza y la concentración de proteínas obtenidas en geles desnaturalizantes de poli(acrilamida)-SDS. Se incluyen geles representativos de algunos de los pasos mencionados en la purificación de GST-Mdm2 (fig MM-2).

### 10.- Fosforilación “in vitro” de Mdm2:

Los ensayos de fosforilación se llevaron a cabo incubando GST ó GST-Mdm2 (50nM) en ausencia (control de autofosforilación de la muestra) o en presencia de GRK2 recombinante (100nM) en tampón 27mM de TrisHCl PH 7,5, 6mM MgCl<sub>2</sub>, 7,5mM NaF, 1mM EGTA, 1,4mM EDTA, [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP (2-3 cpm/pmol) en un volumen final de 40 µl. La especificidad de la fosforilación por GRK2 se determinó mediante la adición de heparina 15-50 ng/ml, un inhibidor de la actividad catalítica de GRK2. Se incuba 30 minutos a 30° C y la reacción se finaliza con la adición de un volumen igual de tampón de carga. Las muestras se resuelven en geles de poli(acrilamida) SDS-PAGE del 10% y se visualizan mediante autorradiografía. Las bandas correspondientes a GST-Mdm2 se escinden del gel y se cuantifica la radiación incorporada por el método de Cerenkov.

### 11.-Ensayo de asociación “in vitro”:

Las proteínas GRK2 recombinante y GST-Mdm2 en cantidades equimolares (50nM) se incuban en 40 µl de tampón TrisHCl PH 7,4 20mM, EDTA 2mM, Tritón x100 0,5%, Glicerol 10%, NaCl 150mM, BSA 0,05mg/ml durante al menos tres horas a 4° C. Posteriormente se añade 4ml de glutatión sepharose 4B (50%) y tras 1 hora de incubación, se sedimentan las proteínas unidas a la resina por centrifugación (5min. a 2.000xg). Se realizan tres o más lavados por centrifugación con el medio de interacción anteriormente descrito. Se resuelven las proteínas en geles de poli(acrilamida) SDS-PAGE y se visualizan por inmunodetección (6.1).



**Figura MM-3: Dibujo esquemático del ensayo de migración a señales quimiotácticas.**

En la parte superior del dibujo se muestra un “transwell” en cuyo interior se siembra el número de células específico para cada tipo celular.

En la parte inferior se muestra la placa multipocillo con el agente quimiotáctico en su interior, donde se deposita el transwell con las células.

## 12.- Ensayos de Migración:

Para los ensayos de migración hemos usado cámaras transwell con filtro de poro de 8mm de diámetro. En la cámara superior sembramos las células de interés (20.000-40.000 células en función del tipo celular) y en la parte inferior añadimos el agente quimiotáctico de interés en medio de cultivo sin suero: S1P (2,5µM), IGF-1 (50ng/ ml) o Her/ neu (2ng/ml). La migración en respuesta a fibronectina se lleva a cabo en cámaras con filtro cubiertos con este componente

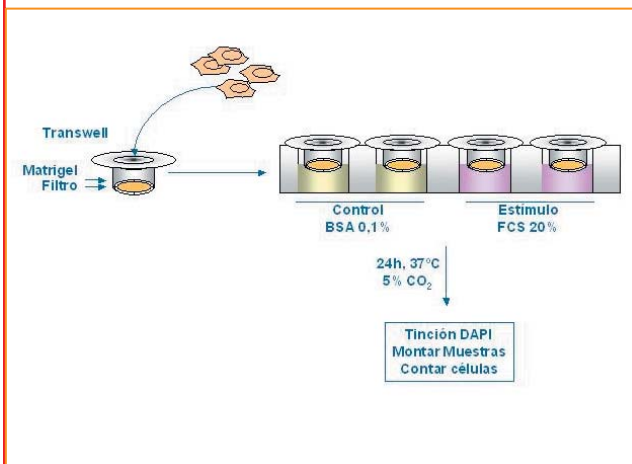


Figura MM-4: Dibujo representativo de ensayos de invasión celular a matrigel.

En el interior del transwell se deposita una capa de 50µl de matrigel que debe secarse a temperatura ambiente. Una vez rehidratado procedemos a sembrar las células en su interior. En la placa multipocillo añadimos las señales quimiotácticas de interés junto con el control de ausencia de señal, BSA 0,1% y colocamos los transwell en el interior de cada pocillo. Transcurridas 24 horas a 37° C, 5% CO<sub>2</sub>, procedemos a montar las muestras para visualizar las células con ayuda de un microscopio de fluorescencia.

a una concentración de 20µg/ml en presencia de medio de cultivo sin suero. Dejamos transcurrir la migración a 37° C, 7% CO<sub>2</sub> durante 4- 6 horas (fig MM-3).

Las células que no hayan migrado se retiran por aspiración del medio y por raspado de la cara superior del filtro con un bastoncillo de algodón. Las células migradas se lavan con PBS 1x dos o más veces y se fijan con metanol durante 30 segundos. Se vuelven a realizar un par de lavados para retirar el metanol y se tiñen con DAPI a una concentración de 5µg/ml en PBS durante diez minutos. Tras el lavado del filtro se procede a su separación del transwell y montaje en portales con el medio de montaje moviol. Las células se visualizaron en el microscopio convencional Axioskop2 plus Zeiss, acoplado a una cámara

coolsnap-Fxcolor, utilizando objetivo 20/25X, en el servicio de microscopía confocal del centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". Se contaron las células en 5 campos independientes. El tratamiento de las imágenes se realizó con el programa "Adobe Photoshop".

## 13.- Ensayos de invasión:

Para estos ensayos usamos las cámaras transwell mencionadas en el apartado anterior a las que se les añade 50µl Matrigel a 15µg/ml en la cara superior del filtro. Esta capa de Matrigel se deja solidificar durante 12 horas a temperatura ambiente y antes de sembrar las células se rehidrata con DMEM y se añade medio de cultivo con 20% FCS en la cámara inferior. Una vez añadimos las células (20.000-40.000 células dependiendo del tipo celular) en la cámara superior, se incuban a 37° C y 7% CO<sub>2</sub> durante 24 horas (fig MM-4). Pasado este tiempo las muestras se procesan igual que en los ensayos de migración.

## 14.-Ensayos de proliferación celular:

Con el fin de analizar el efecto de GRK2 en la proliferación celular, las células MCF-7 se infectan con el adenovirus-GRK2 siRNA o con el adenovirus control a MOI 100, 8-12h tras la infección se realiza un cambio de medio con DMEM/ 10% suero y en el momento previo al ensayo las células se siembran en placas de 96 pocillos (Multiwell-96) (5.000 células/ pocillo). Pasadas 24 horas se añade medio fresco y tratamos con el reactivo CellTiter 96® AQueous (Promega), que permite determinar colorimétricamente el número de células viables y en proliferación. Las células se incuban una hora a 37° C, 7% CO<sub>2</sub> y se tratan con luz U.V.A para inactivar el virus, tras la comprobación previa de que la luz U.V.A no afecta a la medida colorimétrica. Las placas se analizan a las 24, 48 y 72 horas después de sembrar las células mediante un espectrofotómetro de placas a 490nm. La cantidad de producto formado medido a la absorbancia anteriormente mencionada está directamente relacionado con el número de células viables.

## 15.- Procesamiento de tumores de pacientes con carcinoma ductal de mama:

Las muestras de carcinomas de mama ductales de pacientes del Hospital Universitario de La Paz se disgregaron mecánicamente en un mortero con N2 líquido para su posterior lisis en el tampón NaCl 0,3M, Hepes pH 7,5, 20mM, EDTA 0,1mM, CHAPS 2%, glicerol 10%, DTT 1mM, ortovanadato de Na 1mM, NaF 5mM e inhibidores de proteasas. Seguidamente se sonizó a 4° C y el lisado se clarificó por centrifugación a

13000 rpm durante 5 minutos a 4° C. Por último, se resuelven las proteínas del sobrenadante obtenido en geles de poliacrilamida-SDS PAGE al porcentaje deseado.

#### 16.-Medida de proteínas:

La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (1976) o por el método de Lowry y cols. (1951), utilizando albúmina de suero bovino como estándar para construir la recta patrón.

#### 17.-Tratamiento matemático y estadístico de los datos:

Los experimentos se realizaron, como mínimo, tres veces y en general los puntos se llevaron por duplicado o triplicado. Los datos se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar de la media ( $\pm$ SEM).

Para los cálculos de las constantes cinéticas de las reacciones enzimáticas, se asumió el comportamiento de Michaelis-Menten de las quinasas. Se confeccionaron los gráficos con el programa de Excel de ajuste de mínimos cuadrados y se pasaron a calcular los parámetros cinéticos: constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) y velocidad máxima ( $V_{max} = V_o$  (nmol de  $PO_4^{3-}$  incorporado. mg de enzima<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>).

El análisis estadístico se realizó mediante el test de prueba "t de student bilateral" (de dos colas) y n-1 grados de libertad donde la hipótesis nula es que no existe diferencia significativa entre la situación o condición cuya significatividad estadística queremos determinar y la situación control o basal. El valor correspondiente a la probabilidad del cumplimiento de la hipótesis nula (P) obtenido en cada caso varió de  $P < 0,001$  o  $P < 0,0001$  como se detalla en las figuras.







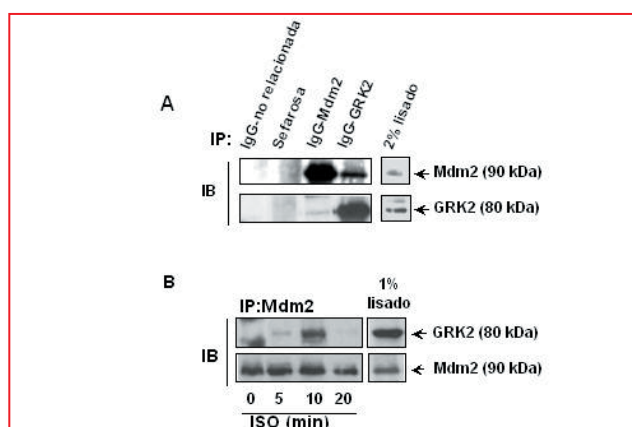
2003).

En este contexto, nos preguntamos si Mdm2 participaba también en la ubiquitilación de GRK2, modulando así su estabilidad. Como primer abordaje, analizamos la posible co-inmunoprecipitación de ambas proteínas en células MCF-7. Como se observa en la figura 1A, ambas proteínas expresadas endógenamente se encuentran en el mismo complejo macromolecular en condiciones de no-estímulo tras la inmunoprecipitación con anticuerpos anti-GRK2 o anti-Mdm2. La co-inmunoprecipitación de GRK2 y Mdm2 en condiciones endógenas aumenta de modo transitorio en células HeLa tras la estimulación con isoproterenol (fig 1B). Existe pues una subpoblación de las proteínas GRK2 y Mdm2 asociadas basalmente en estado estacionario, que tras la estimulación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos se incrementa en paralelo a la velocidad de degradación y el grado de ubiquitilación de GRK2.

## 1. - IMPLICACIÓN DE MDM2 EN LA DEGRADACIÓN DE GRK2.

1.1. - Mdm2 se asocia a GRK2 y esta asociación se ve favorecida por la estimulación del receptor  $\beta$ 2-AR y por la presencia de  $\beta$ -arrestina.

GRK2 muestra una activa regulación a nivel post-traducciona. De modo similar a otras moléculas cuyos niveles de expresión se regulan modulando la estabilidad de la proteína, GRK2 exhibe una rápida degradación por la vía del proteasoma con una vida media de aproximadamente 1 hora. La proteólisis de GRK2 está sujeta a diversos mecanismos de control. Así, la degradación de la quinasa se estimula por la activación de ciertos receptores GPCRs como el  $\beta$ 2-AR y el CXCR4. Este proceso es absolutamente dependiente de la actividad catalítica de la propia quinasa (Penela, 1998) y se favorece por el reclutamiento de la molécula adaptadora  $\beta$ -arrestina a las inmediaciones del receptor activado (Penela, 2001).  $\beta$ -arrestina interacciona con diferentes proteínas implicadas directamente en la modificación post-traducciona de GRK2 (fosforilación por MAPK, c-Src). Dichas modificaciones activan la ubiquitilación de GRK2 y su degradación por la vía del proteasoma (Elorza, 2000; Penela, 2001). Asimismo,  $\beta$ -arrestina interacciona con varias actividades E3 ligasa, de las cuales Mdm2 es responsable de la ubiquitilación de  $\beta$ -arrestina, participando así en procesos de internalización y reciclaje de receptores (Shenoy, 2001; Wang,



**Figura 1: GRK2 y Mdm2 se asocian de manera dependiente de la activación de GPCRs**

**A)** Asociación de Mdm2 y GRK2 endógenos. Lisados de células MCF-7 se inmunoprecipitaron con diferentes anticuerpos anti-Mdm2 (SMP14), anti-GRK2 (clon C5/1.1), y un anticuerpo (IgG) no relacionado. Como control negativo se llevó a cabo la inmunoprecipitación en ausencia de anticuerpos. Los inmunoprecipitados, se resolvieron en geles de acrilamida SDS-PAGE, y la presencia de GRK2 y Mdm2 se detectó con anticuerpos específicos mediante análisis por inmunodetección. Se muestra la cantidad de GRK2 y Mdm2 presentes en un porcentaje del lisado total.

**B)** Las células HeLa se crecieron en placas de cultivo de 150mm y se mantuvieron durante 2 horas sin suero. Posteriormente, se pre-trataron con un antagonista del receptor  $\beta$ 2-adrenérgico, a una concentración de  $10\mu\text{M}$  durante 15 minutos para reducir la asociación basal de Mdm2 y GRK2 previamente a la estimulación con  $10\mu\text{M}$  isoproterenol (ISO) durante los tiempos indicados. La formación de complejos Mdm2/ GRK2 se analizó mediante ensayos de co-inmunoprecipitación.

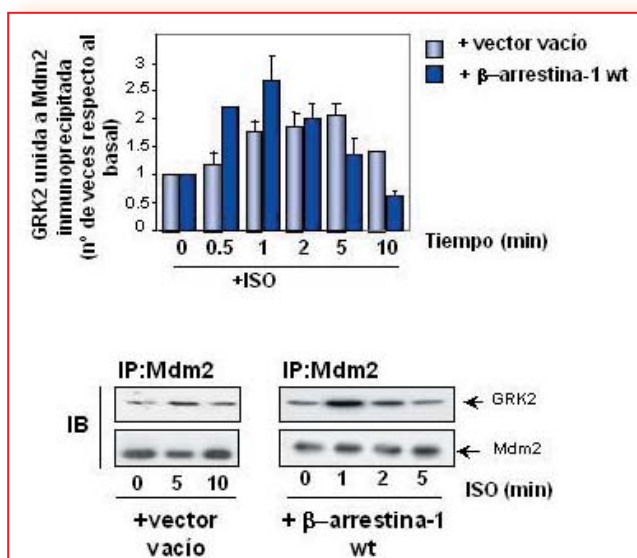
A continuación analizamos si  $\beta$ -arrestina podía ejercer un papel en la asociación de estas proteínas. La sobreexpresión transitoria de  $\beta$ -arrestina en células HEK-293 promovía un incremento notable tanto en la cinética como en el grado de la asociación de GRK2 y Mdm2. Así, se alcanza un máximo de asociación en presencia de  $\beta$ -arrestina exógena al minuto de estimulación en comparación con el máximo observado a los cinco minutos en las células control (fig 2A).

Estos resultados indican que  $\beta$ -arrestina desempeña un papel positivo en la interacción de GRK2 con la ligasa Mdm2. Con objeto de demostrar si su papel era crítico en la degradación de GRK2, determinamos la estabilidad de GRK2 endógena en células MEFs nulas para la expresión de  $\beta$ -arrestina 1 y 2 y en células MEFs no modificadas genéticamente. Las células se trataron con cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas, y los niveles de GRK2 se analizaron mediante inmunodetección. La tasa de desaparición de GRK2 tras el bloqueo es significativamente menor en las células que carecen de  $\beta$ -arrestinas comparado con las células

silvestres (fig 3), lo cual sugiere que  $\beta$ -arrestina desempeña un papel importante en la regulación de la estabilidad de GRK2, probablemente gracias al reclutamiento de proteínas clave para este proceso (ligasas, quinasas moduladoras u otros factores).

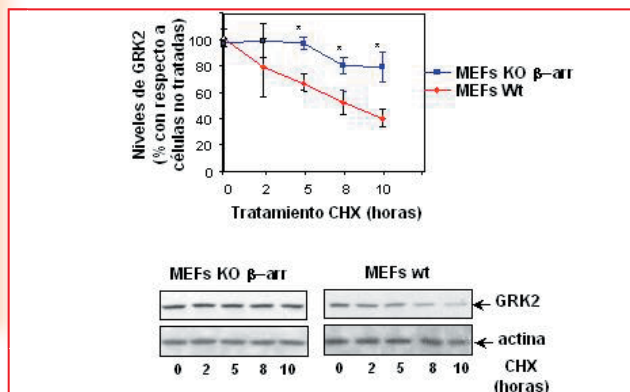
## 1.2.- Mdm2 promueve la degradación de GRK2 por la vía del proteasoma.

Puesto que Mdm2 es una E3 ligasa quisimos saber si era capaz de promover la ubiquitilación y degradación de GRK2. Para ello, determinamos la vida media de GRK2 mediante experimentos de pulso y caza en presencia de Mdm2 en células HEK-293. La sobreexpresión de la ligasa estimula la degradación de GRK2, puesto que tras una hora de caza se detecta en presencia de Mdm2 transitoriamente transfectada un  $37 \pm 1\%$  de la proteína GRK2 inicialmente marcada ó GRK2 restante, frente a un  $56 \pm 3\%$  en condiciones de no sobreexpresión de la ligasa (fig 4A). Por otro lado, la adición del inhibidor del proteasoma MG132 es capaz de revertir el aumento en la degradación de GRK2 debido a la sobreexpresión de Mdm2, descartando así la posibilidad de que la ligasa promoviera la degradación por una vía distinta a la del proteasoma (fig 4B). Es más, Mdm2 es capaz de inducir la



**Figura 2: La sobreexpresión de  $\beta$ -arrestina incrementa la asociación de GRK2 /Mdm2 en respuesta a isoproterenol.**

Células HEK-293 transfectadas con los plásmidos de expresión de GRK2,  $\beta$ 2AR y Mdm2, en presencia o ausencia de  $\beta$ -arrestina-1 se estimularon con  $10 \mu\text{M}$  isoproterenol durante los tiempos indicados. Los complejos GRK2/Mdm2 se co-inmunoprecipitaron según se indica en Materiales y Métodos. La presencia de GRK2 asociada a Mdm2 en condiciones basales se tomó como control. Los datos densitométricos se normalizaron en relación al total de Mdm2 inmunoprecipitado en cada caso. Se representa la media  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes. En la figura se muestra un gel representativo.



**Figura 3:  $\beta$ -arrestina es necesaria para la degradación de GRK2.**

La degradación normal de la proteína GRK2 está impedida en células nulas para la expresión de  $\beta$ -arrestina-1 y  $\beta$ -arrestina-2. Los niveles de proteína de GRK2 se examinaron mediante inmunodetección tanto en células MEFs salvajes como en MEFs carentes de  $\beta$ -arrestina-1 y -2 tras tratamientos con cicloheximida (CHX) durante los tiempos indicados. La cantidad de GRK2 a las 0 horas se definió como el 100% y los datos se normalizaron con los niveles de proteína actina. En ambos paneles, se representa la media  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes (\* $p < 0.05$ ), y se incluyen geles representativos.

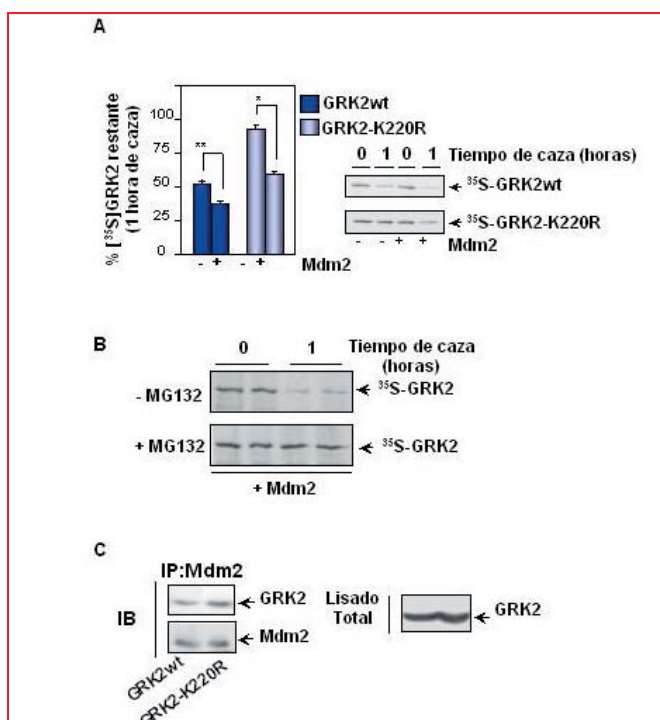


Figura 4: Mdm2 promueve la degradación de GRK2 por la vía del proteasoma.

**A)** Mdm2 aumenta la degradación de GRK2 y rescata la falta de degradación de un mutante de GRK2 catalíticamente defectivo. Células HEK-293 se transfectaron tran-

sitoriamente con GRK2 salvaje (wt) o con el mutante GRK2-K220R en presencia o ausencia de Mdm2. La degradación de la quinasa se analizó mediante experimentos de pulso y caza, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Las proteínas marcadas con <sup>35</sup>S-metionina se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-GRK2 AbFP2 y se resolvieron en geles de acrilamida SDS-PAGE. Las densidades de las bandas de GRK2 marcadas (<sup>35</sup>S-GRK2) se normalizaron en relación a la cantidad total de proteína GRK2 presente en los inmunoprecipitados, determinada mediante inmunodetección. Los datos representan la media ± SEM de 3-4 experimentos independientes realizados por duplicado, \*p<0.05, \*\*p<0.01. Se muestra una autorradiografía de un gel representativo.

**B)** Células HEK-293 que sobreexpresan GRK2 y Mdm2 se pre-trataron con el inhibidor del proteasoma MG132 a una concentración de 30μM o con DMSO durante 1 hora, manteniendo su presencia a lo largo del experimento de pulso y caza. Se muestran autorradiografías representativas de dos experimentos independientes.

**C)** GRK2 salvaje y el mutante K220R se asocian de manera similar a Mdm2. Lisados de células HEK-293 transfectadas con Mdm2 y con las construcciones que se indican de GRK2, se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-Mdm2 (SMP-14). Los complejos obtenidos se analizaron con anticuerpos específicos contra Mdm2 y GRK2.

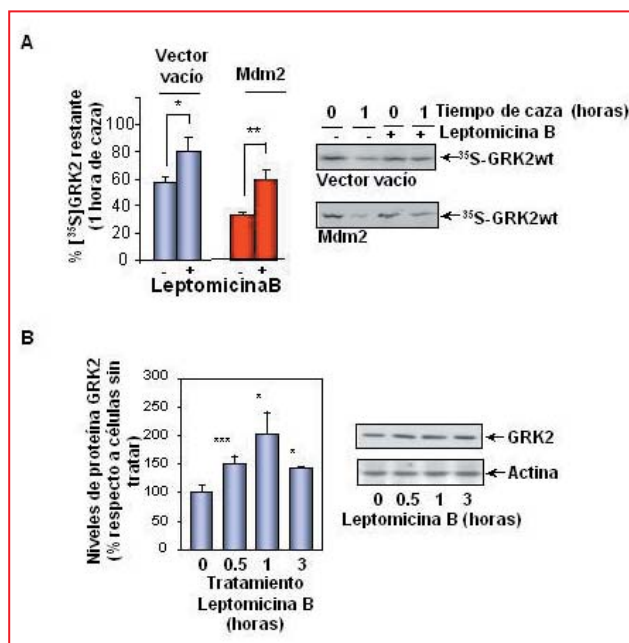
degradación del mutante inactivo de la quinasa GRK2-K220R, que previamente habíamos descrito que se proteoliza muy lentamente (Penela, 1998). En condiciones de expresión exógena de la ligasa se detecta sólo un 60±1% de proteína GRK2 mutante restante tras una hora de caza frente al 92±5% en condiciones control (fig 4A). Estos datos sugerían que el exceso de Mdm2 contrarresta la deficiente interacción de la maquinaria de degradación con el mutante GRK2-K220R, probablemente debido al escaso reclutamiento del complejo Mdm2/ β-arrestina al entorno del receptor, que es dependiente de la fosforilación por GRK2. La figura 4C muestra la similar asociación de Mdm2 tanto a la proteína mutante GRK2-K220R como a la quinasa salvaje, confirmando que la menor degradación de GRK2-K220R no se debe a un defecto intrínseco de interacción con la ligasa, sino probablemente a una menor disponibilidad efectiva de Mdm2 para establecer dicha asociación.

Como ya se indicó en la Introducción de esta memoria, Mdm2 es una proteína altamente regulada a muchos niveles. Uno de ellos es su localización subcelular, que depende de su interacción con distintas proteínas como la anteriormente mencionada β-arrestina, y de modificaciones post-traduccionales como fosforilación y

ubiquitilación. Era pues factible que cambios en la distribución de Mdm2 pudieran modular la disponibilidad de la ligasa para GRK2, tal y como se ha demostrado para otros sustratos.

Debido a que Mdm2 puede localizarse en núcleo, nucleolo y citosol quisimos analizar cómo la distribución de la ligasa en la célula afectaba a la estabilidad de GRK2. Para ello, determinamos mediante experimentos de pulso y caza la degradación de GRK2 en células HEK-293 co-transfectadas o no con Mdm2 en presencia de un inhibidor del tráfico núcleo-citoplasmático (leptomicina B), que restringe la localización de Mdm2 a núcleo, sin afectar la distribución subcelular de GRK2 (datos no mostrados). Según se observa en la figura 5, el tratamiento con leptomicina promueve una menor degradación de GRK2 tanto en condiciones de expresión endógenas (57±5% de GRK2 restante a 1 hora de caza frente a un 80±10% en ausencia y presencia de leptomicina, respectivamente) como exógenas de Mdm2 (34±2% frente a un 60±6% en ausencia y en presencia de leptomicina). Coherentemente con esta menor tasa de reciclaje de la quinasa, los niveles endógenos de GRK2 aumentan progresivamente con la exposición a leptomicina B en células MCF-7 (fig 5B).





Por tanto, podemos concluir que la localización nuclear de Mdm2 promovida por tratamientos con leptomicina B o por contextos de señalización celular que favorezcan la retención nuclear de la ligasa, estabiliza a GRK2 como resultado de la separación física de la ligasa y su sustrato, GRK2.

### 1.3.-Mdm2 modula la ubiquitilación de GRK2.

La degradación por la vía del proteasoma requiere, en general, como paso previo, la poli-ubiquitilación del sustrato para que éste sea reconocido por la proteasa. Como ya se ha mencionado con anterioridad, la estimulación del receptor  $\beta$ 2-AR aumenta el patrón de ubiquitilación de GRK2 y consecuentemente el recambio de la quinasa (Penela, 1998). En dicho contexto, hemos demostrado que la exposición a agonistas  $\beta$ -adrenérgicos aumenta la asociación Mdm2/ GRK2 dependiente de  $\beta$ -arrestina. Puesto que Mdm2 es una proteína ligasa y aumenta la degradación de GRK2, estudiamos si Mdm2 era responsable de su ubiquitilación.

Se transfectaron células HEK-293 con diversas combinaciones de las construcciones del  $\beta$ 2-AR, HA-ubiquitina y GRK2 en presencia o no de Mdm2 sobreexpresado. Tras tratamientos con Isoproterenol, se analizó la presencia de GRK2 mediante inmunodetección en los complejos de ubiquitilación inmunoprecipitados con un anticuerpo que reconoce el epítipo HA de la ubiquitina (fig 6A). Los resultados obtenidos muestran el aumento de la ubiquitilación de GRK2 tanto en presencia de Mdm2 como del agonista iso-

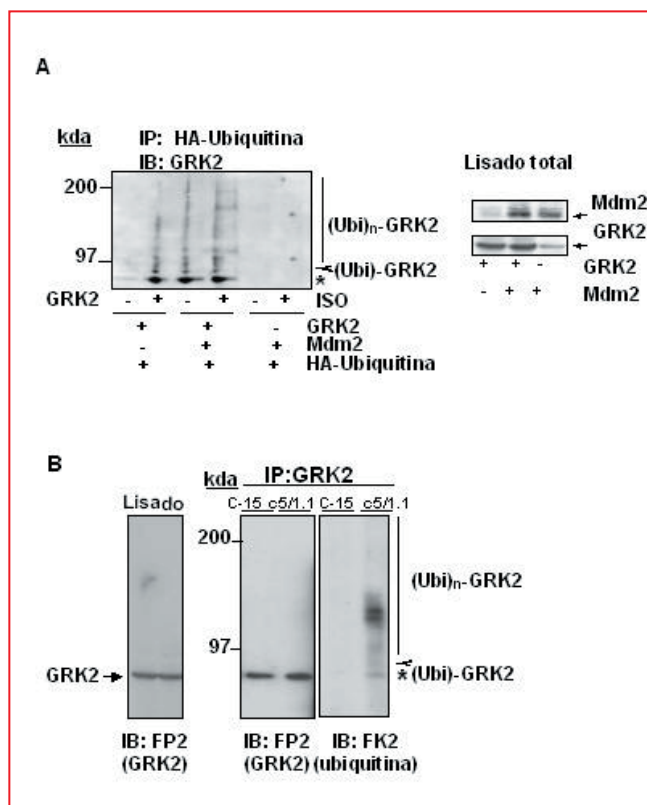
**Figura 5:** La estabilidad de GRK2 depende de la localización celular de Mdm2

**A)** Efecto del tratamiento con leptomicina B (LMB) en la degradación de GRK2. Células HEK-293 co-transfectadas con GRK2 y Mdm2 o un vector vacío, se pre-trataron con LMB o placebo durante una hora. La degradación de GRK2 se determinó mediante experimentos de pulso y caza como se detalla en Materiales y Métodos. La presencia de LMB se mantuvo durante todo el experimento. Se representa la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . Se muestran autorradiografías representativas.

**B)** Células MCF-7 se trataron con LMB durante los tiempos indicados previamente a su lisis. Los niveles endógenos de GRK2 se determinaron mediante inmunodetección. Los datos densitométricos correspondientes a GRK2 se corrigieron por los niveles de actina y se representaron en porcentaje respecto a la condición de no tratamiento. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Se muestra una autorradiografía representativa.

proterenol. Curiosamente, la sobreexpresión de Mdm2 es capaz de promover el mismo patrón de ubiquitilación de GRK2 que la estimulación del receptor y con similar intensidad. Además, la ubiquitilación de GRK2 en presencia de Mdm2 exógena no se incrementa significativamente por la adición de isoproterenol. Esto sugiere que en condiciones de sobreexpresión de Mdm2, la disponibilidad de la ligasa regulada por el adaptador  $\beta$ -arrestina dejaría de ser un paso limitante en la ubiquitilación de GRK2 estimulada por el receptor.

El patrón de ubiquitilación de GRK2, tanto en presencia de Mdm2, exógena o endógena, como de receptores activados es complejo, pudiéndose detectar bandas de GRK2 modificadas de alto peso molecular (rango 97-200Kda). Estas especies corresponderían a la quinasa poli-ubiquitilada, teniendo en cuenta que el peso molecular aparente de GRK2 y ubiquitina es de aproximadamente 80 y 8 Kda, respectivamente. Curiosamente, se detecta una señal de ubiquitilación muy intensa en una banda de ~80 Kda que es reconocida por el anticuerpo anti-GRK2 Ab9 (fig 6A). Esta especie podría corresponder a GRK2 mono-ubiquitilada sin aparente cambio de movilidad electroforética o bien ser un artefacto debido al reconocimiento inespecífico de GRK2 no modificada por el anticuerpo anti-HA. Esta banda de 80 Kda seguía observándose cuando los complejos de ubiquitina se inmunoprecipitaban con otro anticuerpo que reconoce específicamente ubiquitina conjugada (FK2) y dejaba de detectarse cuando los complejos



se revelaban con un anticuerpo (FK1) que sólo reconoce especies poli-ubiquitiladas (datos no mostrados). Asimismo, analizamos el patrón de reconocimiento del anticuerpo FK2, que detecta ubiquitina mono- y poli-conjugada, en los complejos de GRK2 inmunoprecipitados con distintos anticuerpos anti-GRK2 (fig 6B). Así, observamos que en los inmunoprecipitados del anticuerpo c5/1.1, se detectan bandas ubiquitiladas de alto peso molecular (GRK2 poli-ubiquitilado) junto con una banda de 80 Kda (GRK2 monoubiquitilado). Es interesante indicar que el anticuerpo FK2 no detecta ninguna señal en los inmunoprecipitados de GRK2 del anticuerpo C-15, indicando que éste sólo puede reconocer a la quinasa no modificada mientras que el c5/1.1 reconoce a GRK2 independientemente de su estado de ubiquitilación.

Por tanto, Mdm2 promueve la mono- y la poli-ubiquitilación de GRK2. Para explorar si era necesaria y suficiente para llevar a cabo este proceso, analizamos en células MEFs salvajes (que expresan Mdm2 de manera endógena) el patrón de ubiquitilación de GRK2 y lo comparamos con el obtenido en MEFs que carecen bien de Mdm2 o bien de  $\beta$ -arrestinas. Como se puede observar en la figura 7, la ubiquitilación de GRK2 en células salvajes aumenta tras la estimulación con isoproterenol (con un patrón similar al que obteníamos en los ensayos de sobreexpresión de proteínas, fig 5A). En el caso de las MEFs sin Mdm2 la ubiquitilación de GRK2 en condiciones basales es mucho menor que la obtenida en las MEFs silvestres y muy deficiente en respuesta a isoproterenol. Así, desaparecen totalmente las

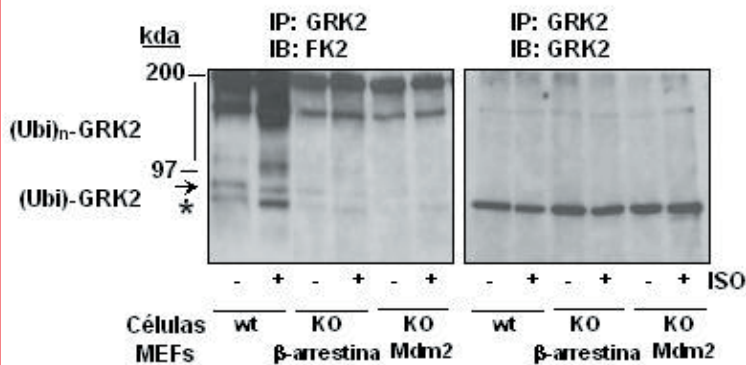
Figura 6: Mdm2 modula la ubiquitilación de GRK2.

**A)** Se transfectoron los plásmidos de expresión de GRK2, HA-Ubiquitina y  $\beta$ 2-AR en presencia o ausencia de Mdm2 en células HEK-293. Después de 2 horas en ausencia de suero, las células se incubaron durante 15 minutos con 10 $\mu$ M isoproterenol o placebo y posteriormente se lisaron para llevar a cabo ensayos de ubiquitilación, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Las diferentes especies de GRK2 poli-ubiquitiladas (ub<sub>n</sub>-GRK2) y mono-ubiquitiladas (ub-GRK2) presentes en los inmunoprecipitados de ubiquitina se indican en la figura. Los asteriscos y las puntas de flecha indican diversas formas de GRK2 mono-ubiquitiladas (ver el texto para más detalle).

**B)** Caracterización de las especies ubiquitiladas de GRK2 tras la estimulación con agonistas  $\beta$ -adrenérgicos en células HEK-293 co-transfectadas con GRK2,  $\beta$ 2-AR y ubiquitina. GRK2 total se inmunoprecipita de los lisados celulares con un anticuerpo policlonal anti-GRK2 (C-15) o con un anticuerpo monoclonal anti-GRK2 (c5/1.1). Los inmunoprecipitados se someten a análisis por inmunodetección con los anticuerpos anti-ubiquitina, FK2, que reconoce formas mono- y poli-ubiquitiladas, y con el anticuerpo anti-GRK2 (PF2). Sólo el anticuerpo c5/1.1 inmunoprecipita formas de GRK2 que posteriormente se detectan con el anticuerpo FK2. Los asteriscos indican la posición de una especie proteica que migra a 80Kda y que es reconocida tanto por FK2 como por anticuerpos anti-GRK2 en los inmunoprecipitados y en lisados, indicando que una proporción de GRK2 modificada con mono-ubiquitina co-migra con la quinasa no modificada en nuestras condiciones experimentales de SDS-PAGE.

bandas correspondientes a la mono-ubiquitilación de GRK2 y las poli-ubiquitiladas en el rango de 80-97 Kda, mientras que se atenúan las de mayor peso molecular. Estos resultados confirman que la presencia de Mdm2 es necesaria para el proceso de ubiquitilación de GRK2 en respuesta a estímulo. Por otra parte, la ausencia de  $\beta$ -arrestina da lugar a un defecto de ubiquitilación de GRK2 parecido al que obtenemos en ausencia de Mdm2, confirmando la hipótesis de que  $\beta$ -arrestina actúa como molécula adaptadora de Mdm2.

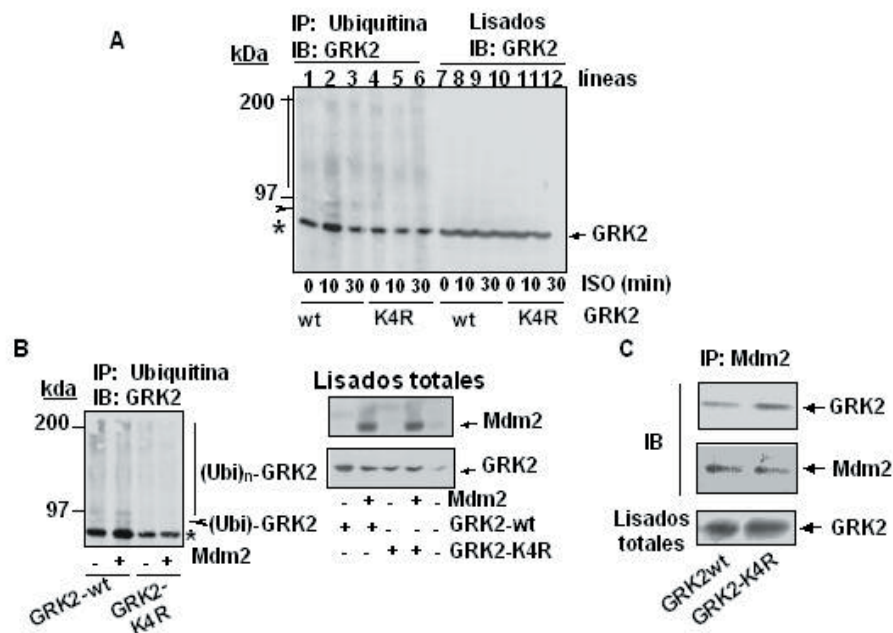
El siguiente paso que nos planteamos fue identificar los residuos de lisina que podían ser ubiquitilados por Mdm2. Para ello generamos un mutante de GRK2 en el que lisinas del extremo amino terminal se sustituyeron por argininas (K19/21/30/31R). Estos residuos eran “a priori” buenos sitios candidatos porque definían una secuencia rica en lisinas potencialmente reconocible por Mdm2, tal y como se ha observado en otros sustratos de la ligasa (Rodríguez, 2000). Además, este grupo de lisinas se encuentra muy cerca de la región de GRK2 que sufre el primer corte proteolítico por el proteasoma (Penela, 1998).



**Figura 7:** La ubiquitilación de GRK2 depende de Mdm2 y β-arrestinas.

La ubiquitilación de GRK2 endógeno se bloquea tanto en células carentes de Mdm2 como en las carentes de β-arrestina en condiciones basales y de estimulación. Células MEFs salvajes y nulas para la expresión de Mdm2 o de β-arrestina-1 y -2 ( $50 \times 10^6$ ) se mantuvieron sin suero durante 2 horas y se estimularon con  $10 \mu\text{M}$  isoproterenol o placebo durante 15 minutos, en presencia de suero. Las células se procesaron como anteriormente y las formas ubiquitiladas de GRK2 endógeno se analizaron en los complejos inmunoprecipitados con un anticuerpo monoclonal específico anti-GRK2 (c5/1.1) mediante inmunodetección con el anticuerpo anti-ubiquitina FK2. Posteriormente, las membranas se incubaron (panel derecho) con un anticuerpo policlonal específico anti-GRK2 (C-15) para confirmar que la cantidad de carga de GRK2 es similar en todas las condiciones.

pitados con un anticuerpo monoclonal específico anti-GRK2 (c5/1.1) mediante inmunodetección con el anticuerpo anti-ubiquitina FK2. Posteriormente, las membranas se incubaron (panel derecho) con un anticuerpo policlonal específico anti-GRK2 (C-15) para confirmar que la cantidad de carga de GRK2 es similar en todas las condiciones.



**Figura 8:** Las lisinas de GRK2 ubiquitiladas por Mdm2 se localizan en el extremo N-terminal de la proteína.

**A)** La mutación de residuos críticos K19, 21, 30, 31 en el extremo N-terminal de GRK2 impide la ubiquitilación de la quinasa en respuesta a la estimulación del β2-AR. Células co-transfectadas con β2-AR y GRK2 salvaje o el mutante GRK2-K19, 21, 30, 31R se estimularon con isoproterenol durante los tiempos indicados. La ubiquitilación de GRK2 se analizó mediante inmunoprecipitación de los lisados celulares con el anticuerpo específico anti-ubiquitina, FK2 y posterior inmunodetección con el anticuerpo anti-GRK2 (Ab-9) generado contra la proteína recombinante.

**B)** La mutación de residuos de lisinas en el extremo N-terminal de GRK2 impide la ubiquitilación de la quinasa en presencia de Mdm2. Las células HEK-293 se transfectaron con el plásmido de expresión de ubiquitina y con GRK2 salvaje ó con el mutante GRK2-K19,21,30,31R (GRK2-K4R) en presencia y ausencia de Mdm2. Se analizó el patrón de ubiquitilación de la quinasa como en el apartado A. Los niveles de expresión de GRK2 y de Mdm2 se confirmaron en los lisados mediante inmunodetección.

**C)** Asociación de Mdm2 con el mutante en lisinas de GRK2 defectivo en ubiquitilación. Se analizó en células HEK-293, co-transfectadas con Mdm2 y GRK2 salvaje o el mutante GRK2-K19,21,30,31R, la formación de complejos entre GRK2 y Mdm2 mediante co-inmunoprecipitación.



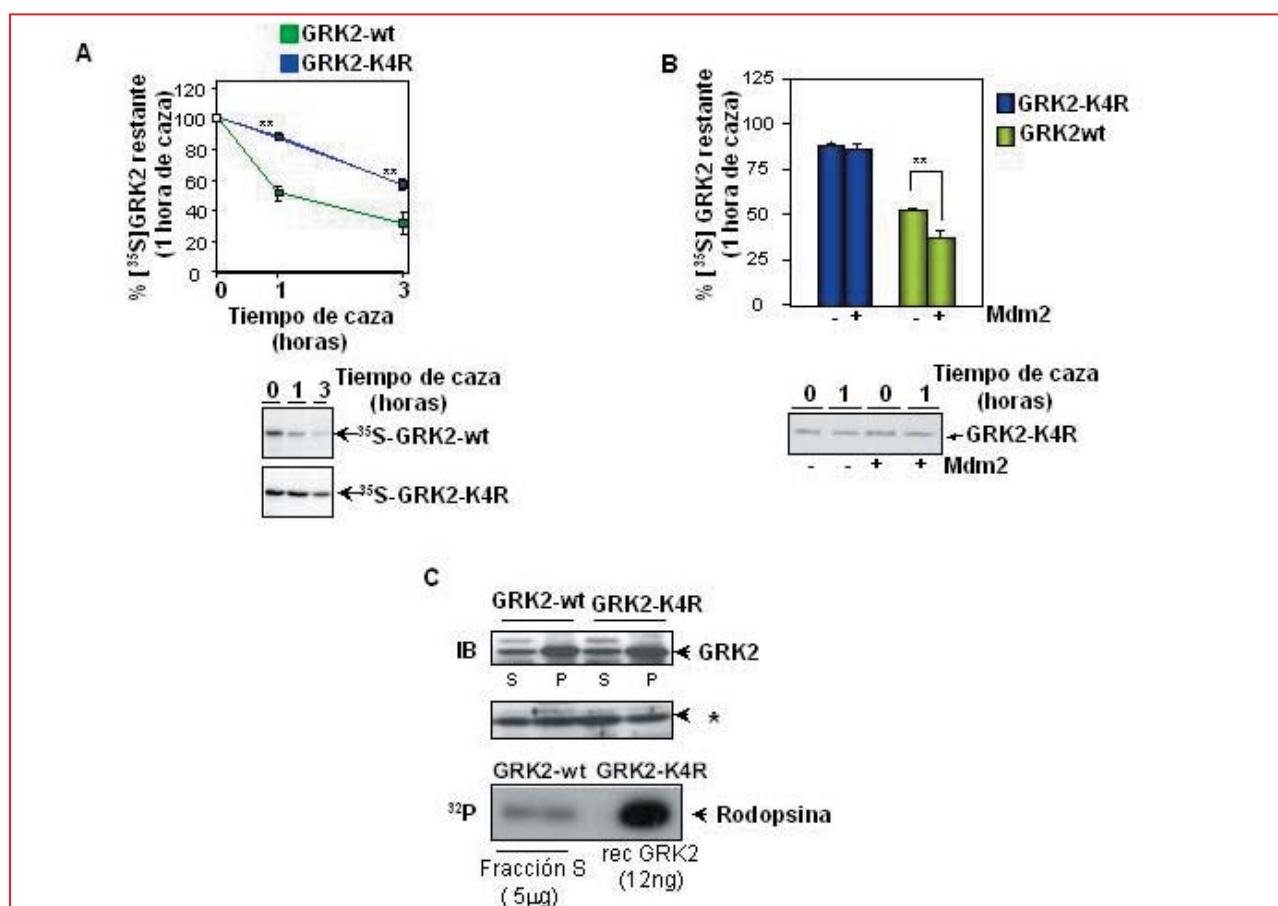


Figura 9: Las lisinas 19/21/30/31 son necesarias para la degradación de GRK2.

**A)** El recambio de GRK2 salvaje y del mutante GRK2-K19,21,30,31R (GRK2-K4R) en células HEK-293 transfectadas transitoriamente se ensayó mediante experimentos de pulso y caza, tal como se describe en Materiales y Métodos.

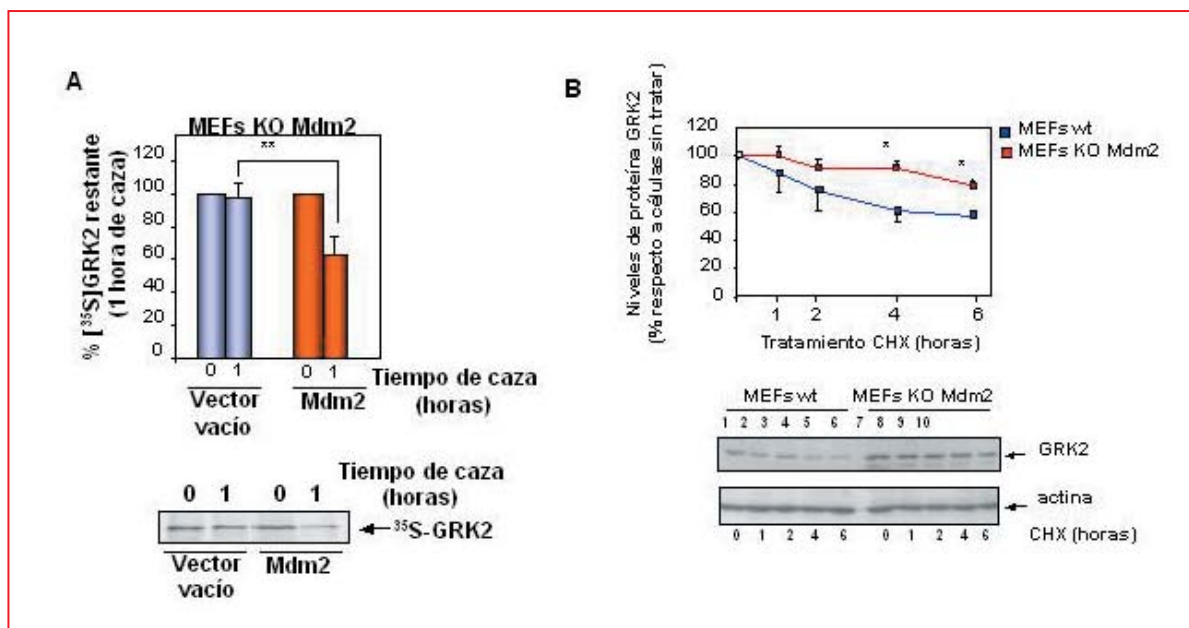
**B)** El efecto de Mdm2 exógeno en la estabilidad de GRK2 se determinó en células HEK-293 co-transfectadas transitoriamente con GRK2 salvaje o con el mutante GRK2-K4R. Se muestran geles representativos y los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM de 3-4 experimentos independientes (\*\* $p < 0.01$ ).

**C)** La actividad y localización subcelular del mutante de GRK2 en lisinas es similar a la de la proteína salvaje tal y como muestran los ensayos de fosforilación “in vitro” de rodopsina y fraccionamiento subcelular, respectivamente. Las fracciones soluble citosólica (S) y la particulada de membranas (P), obtenidas como se detalla en Materiales y Métodos, se analizaron mediante inmunodetección con anticuerpos anti-GRK2 específicos. La cantidad relativa de una proteína inespecífica reconocida por estos anticuerpos (\*) se muestra como control de la presencia equivalente de proteínas transfectadas rec-GRK2, proteína recombinante.

Se analizó, pues, el patrón de ubiquitilación del mutante GRK2-K19/21/30/31R, (denominado K4R) sobreexpresado de manera transitoria en células HEK-293 junto con el receptor  $\beta$ 2-AR y HA-Ub. La modificación de este grupo de lisinas originaba una ubiquitilación defectiva de la proteína GRK2-K4R tanto en condiciones basales como en condiciones de estimulación (fig 8A). Es más, la sobreexpresión de Mdm2 no es capaz de rescatar la falta de ubiquitilación de este mutante (fig 8B), sugiriendo que estas cuatro lisinas son ubiquitiladas por Mdm2 y en parte responsables del patrón de la mono y poli-ubiquitilación de la quinasa. La ubiquitilación defectiva de este mutante no se debe a cambios conformacionales

que impidan su asociación con la ligasa (fig 8C), confirmándose así el papel específico de las lisinas 19/21/30/31 en la ubiquitilación.

Este mutante, al no ubiquitilarse adecuadamente, podría no ser detectado eficientemente por el complejo del proteasoma y, por tanto, presentar afectada su degradación por esta vía. En consecuencia, analizamos el recambio de GRK2-K19/21/30/31R mediante experimentos de pulso y caza en células HEK-293 transitoriamente transfectadas con dicha construcción. La proteína mutante tiene una vida media hasta tres veces mayor que la proteína normal en condiciones basales (fig 9A). Es más, la expresión exó-



**Figura 10:** La ligasa Mdm2 está implicada en la degradación de GRK2.

**A)** Células MEFs carentes de Mdm2 se transfirieron con GRK2 salvaje en presencia o ausencia de Mdm2. Se analizó la tasa de degradación de la proteína GRK2 tras 1 hora de caza, mediante experimentos de pulso y caza.

**B)** La estabilidad de GRK2 endógena se encuentra aumentada en ausencia de Mdm2. Los niveles de GRK2 se examinaron por inmunodetección en lisados de células tratadas con cicloheximida (CHX) durante los tiempos indicados. La cantidad de GRK2 a las 0 horas se definió como el 100%, y los datos se normalizaron en relación a los niveles de la proteína actina. En ambos paneles los datos representan la media ± SEM de 4 experimentos independientes (\*p<0.05, \*\*p<0.01). Se muestran geles representativos.

gena de Mdm2 no consigue incrementar la degradación, obteniéndose valores de  $88 \pm 3\%$  de GRK2 K19/21/30/31R restante tras una hora de caza en presencia de Mdm2 comparado con un  $86 \pm 4\%$  sin Mdm2 (fig 9B). Estos resultados contrastan con el aumento en la degradación que la ligasa causa en GRK2 wt y en GRK2 K220R (fig 4A), mutante defectivo en degradación pero que posee las lisinas ubiquitilables por Mdm2 intactas. Es de destacar que la distribución subcelular y la actividad del mutante GRK2-K4R frente a sustratos GPCRs de GRK2 no se ven afectadas tal y como muestra la figura 9 C. Dado que la degradación remanente de GRK2-K19/21/30/31R se bloquea con inhibidores del proteasoma (datos no mostrados), la proteólisis defectiva de este mutante no se debe a la selección de una vía de degradación alternativa menos eficiente, causada por cambios conformacionales secundarios a la mutación. En resumen, las lisinas 19,21,30,31 parecen ser residuos críticos para la correcta ubiquitilación de GRK2 por Mdm2 en condiciones basales y tras la estimulación de receptores GPCRs.

Dado que los resultados obtenidos demostraban que Mdm2 era una ligasa necesaria y suficiente para la ubiquitilación de GRK2, quisimos determinar si dicha ubiquitilación era también suficiente y necesaria para promover la degradación de GRK2. Para ello, analizamos la vida media de GRK2, mediante experimentos de pulso y caza, en células MEFs que carecen de Mdm2 transfectadas transitoriamente con la quinasa. En la figura 10 A se observa que la degradación de GRK2 está impedida en estas células, ya que tras una hora de caza los niveles de GRK2 se mantienen en un  $98 \pm 9\%$ . Esta estabilización de la proteína es muy parecida a la que se obtenía en condiciones de no ubiquitilación de GRK2 (fig 9 A y B). Por el contrario, la re-introducción de Mdm2 en estas células reestablece la degradación de la quinasa (fig 10A) hasta niveles similares a los obtenidos en líneas celulares que expresan endógenamente Mdm2 (ver figura 5A).

Para confirmar la participación de Mdm2 en la degradación de GRK2 en condiciones fisiológicas, analizamos los niveles de GRK2 endógeno en células MEFs salvajes y en las células MEFs nulas para Mdm2, tras tratamientos con el inhibidor de síntesis proteica, cicloheximida. La figura 10 B muestra que la degradación de

#### 1.4.-La degradación de GRK2 se inhibe en ausencia de Mdm2.

GRK2 está muy retardada en ausencia de Mdm2 en comparación con las células salvajes. Es más, los niveles de GRK2 endógenos en estado estacionario sin tratamiento con cicloheximida son mayores en las células nulas para Mdm2 que en las células salvajes (comparar las líneas 6 y 1 del panel inferior de la figura 10B), indicando que la ausencia de la ligasa reduce la degradación de GRK2 y produce una mayor acumulación de la proteína en la célula.

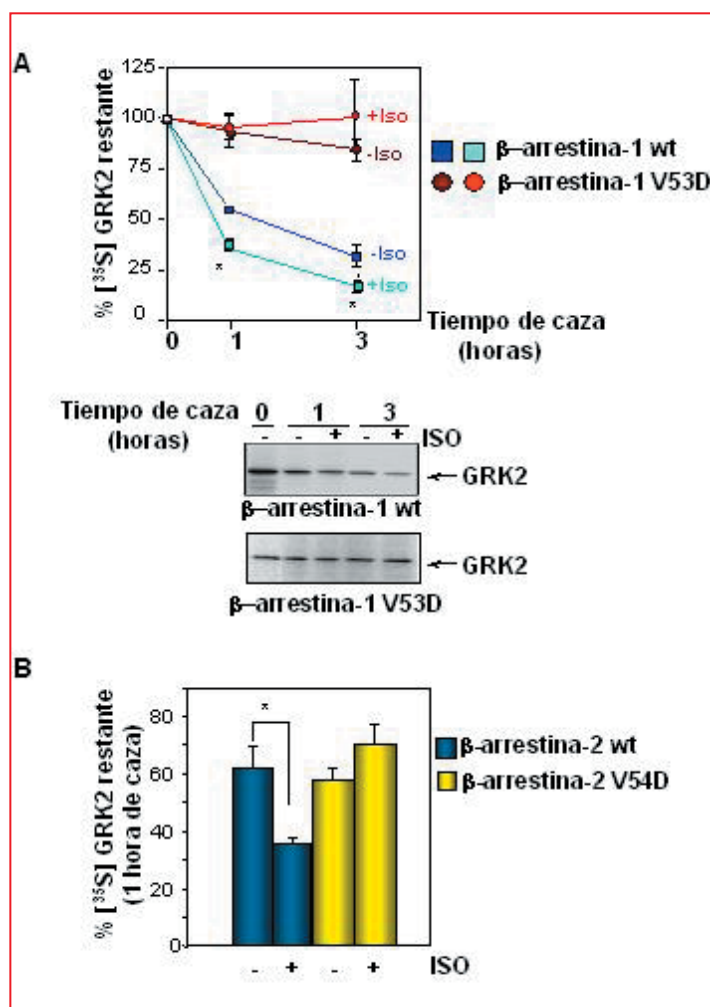
## 2.- MECANISMOS MOLECULARES DE LA PARTICIPACIÓN DE $\beta$ -ARRESTINA EN LA DEGRADACIÓN DE GRK2 POR MDM2.

### 2.1.- Efecto diferencial de un mutante de $\beta$ -arrestina-1 y su equivalente de $\beta$ -arrestina-2 en la degradación de GRK2.

Nuestros datos establecían que Mdm2 ubiquitila a GRK2 y que esta modificación dirige la quinasa a la degradación por el proteasoma.

Asimismo, hemos demostrado que la función de  $\beta$ -arrestina es necesaria para que Mdm2 module la estabilidad de la quinasa dependiente de la activación de GPCRs. La función de andamiaje proporcionada por  $\beta$ -arrestinas, en las proximidades del receptor, permitiría el reclutamiento de múltiples proteínas al complejo del receptor activado en el que se encontraría GRK2. Además de la ligasa Mdm2,  $\beta$ -arrestina recluta quinasas como c-Src, que promueve la fosforilación de GRK2 en tirosinas (Sarnago, 1999) y ERK, que lo hace en la serina 670 (Elorza, 2000). Datos previos de nuestro grupo demuestran que ambas modificaciones son también determinantes en promover la degradación estimulada de GRK2 por agonistas de receptores GPCRs (Elorza, 2000; Penela, 2001). Por tanto, se planteaba si  $\beta$ -arrestinas podrían estar modulando la estabilidad de GRK2 por vías alternativas e independientes (la vía de c-Src y ERK y la vía de Mdm2), o bien si las distintas actividades reclutadas por  $\beta$ -arrestina podrían formar parte de una misma vía, cuyo paso final es la actuación de la ligasa Mdm2.

En consecuencia, analizamos en más detalle el mecanismo de acción de  $\beta$ -arrestinas en la degradación de GRK2. Inicialmente, estudiamos el efecto en la degradación de GRK2 del mutante  $\beta$ -arrestina-2 V54D, que no interacciona adecuadamente con Mdm2 (Wang, P, 2002; Wang, 2003) y de la mutación equivalente en  $\beta$ -arrestina-1 (V53D), en células HEK-293 transitoriamente co-transfectadas con  $\beta$ 2-AR y GRK2. Como muestra la figura 11 A, la presencia de  $\beta$ -arrestina-1 V53D impide la degradación de GRK2 tanto en condiciones normales como de estimulación del receptor por isoproterenol. Sin embargo, para nuestra sorpresa, la expresión de  $\beta$ -arrestina-2 V54D sólo bloqueaba la degradación de GRK2 en respuesta a agonista, sin afectar a la degradación basal de la quinasa (fig 11B).



**Figura 11:** El mutante  $\beta$ -arrestina-1 V53D bloquea la degradación de GRK2

**A)** La estabilidad de GRK2 en células HEK-293 co-transfectadas transitoriamente con los plásmidos de expresión de  $\beta$ 2-AR y  $\beta$ -arrestina-1 salvaje o mutante  $\beta$ -arrestina-1 V53D se determinaron mediante experimentos de pulso y caza en presencia o ausencia de isoproterenol. Se muestran geles representativos de la proteína GRK2 marcada con  $^{35}$ S-metionina.

**B)** Experimentos similares se llevaron a cabo para determinar la degradación de GRK2 en presencia de  $\beta$ -arrestina-2 salvaje y el mutante  $\beta$ -arrestina-2 V54D.

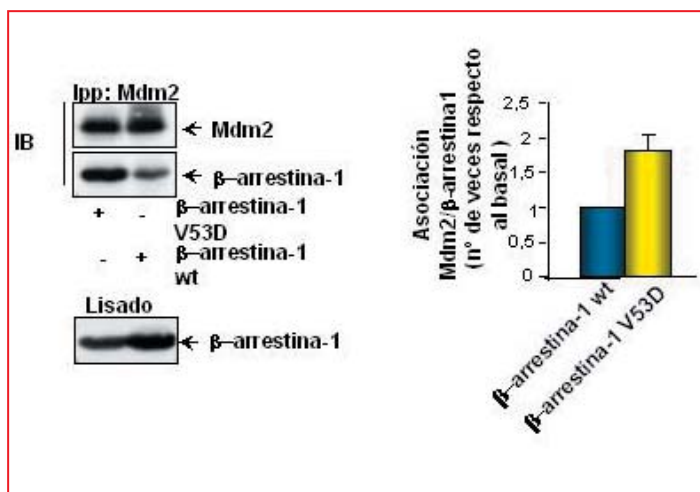


Figura 12: Mdm2 se asocia más intensamente al mutante β-arrestina-1 V53D que a la proteína salvaje.

La asociación de Mdm2 con las proteínas β-arrestinas-1 salvaje y el mutante V53D se determinó mediante inmunoprecipitación de los lisados de células HEK-293 co-transfectadas con las construcciones indicadas con el anticuerpo anti-Mdm2 (SMP14) y posterior inmunodetección con anticuerpos anti-β-arrestinas.

Por tanto, mutaciones equivalentes en dos proteínas homólogas estructural y funcionalmente daban lugar a efectos distintos. Las proteínas β-arrestina-1 V53D y β-arrestina-2 V54D tienen igualmente inhibidas sus capacidades tanto de interacción con el receptor fosforilado como de reclutamiento de actividades c-Src y ERK (Luttrell, 1999). Nuestros datos de co-inmunoprecipitación de Mdm2 con β-arrestina-2 V54D confirman el defecto de asociación de este mutante con Mdm2 (datos no mostrados) (Wang, 2002). Sin embargo, Mdm2 es capaz de asociarse muy eficientemente a β-arrestina-1 V53D, hasta casi dos veces más que la proteína β-arrestina 1 no mutada (fig 12). Por tanto, β-arrestina-1 V53D y β-arrestina-2 V54D muestran una capacidad diferencial para asociarse a Mdm2 y modular la estabilidad de GRK2. Podemos especular que, en condiciones de estimulación de receptores, la degradación defectiva de GRK2 inducida por las mutaciones V53D y V54D podría estar relacionada con el reclutamiento defectivo de c-Src y ERK por estos mutantes de β-arrestinas. Por el contrario, en condiciones de no estimulación de GPCRs, la asociación aberrante de Mdm2 a β-arrestina-1 V53D causaría el bloqueo de la degradación de GRK2. En este contexto, β-arrestina-1 V53D actuaría como “dominante negativo” de las β-arrestinas endógenas en la degradación de GRK2, mientras que la capacidad de estas proteínas endógenas para reclutar reguladamente Mdm2 sería suficiente para mantener la degradación basal de GRK2 en presencia de β-arrestina-2 V54D.

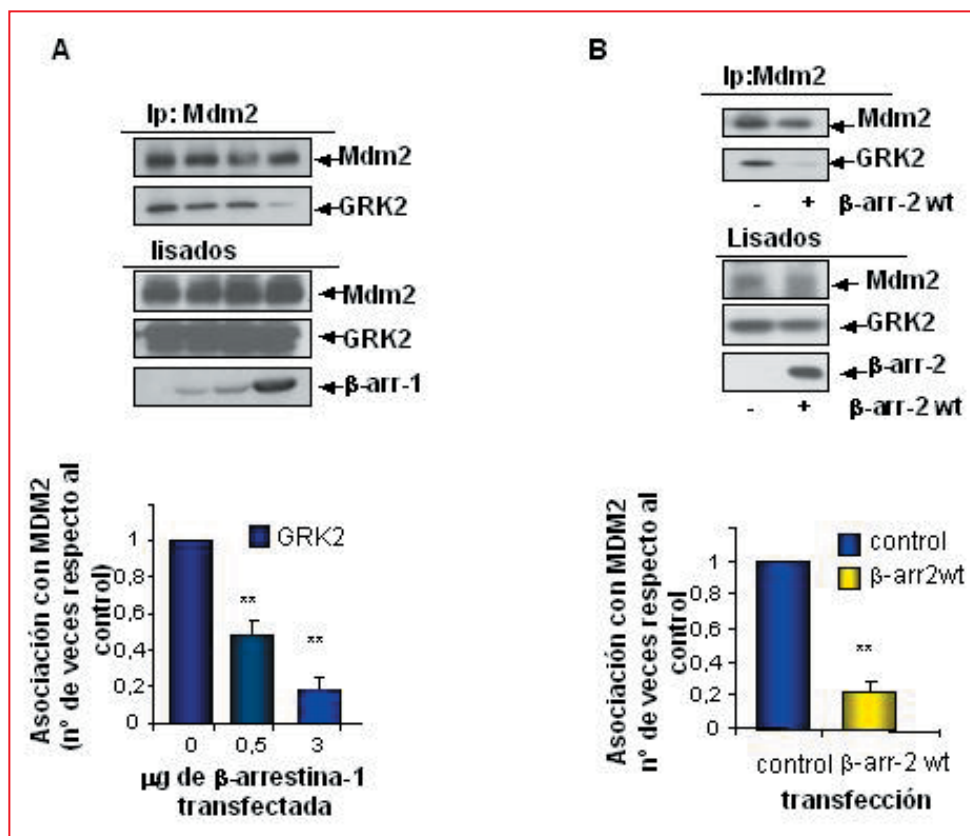
## 2.2.- GRK2 y β-arrestinas compiten por Mdm2 en el entorno del receptor.

Dado que la mayor asociación de Mdm2 a β-arrestina-1 V53D no se correlaciona con una mayor degradación de GRK2, sino al contrario, se sugería que estas proteínas no estarían presentes simultáneamente en el mismo complejo macromolecular en condiciones basales. Podría, por tanto, establecerse una relación de competencia entre GRK2 y β-arrestina-1wt ó β-arrestina-2wt por Mdm2. Para confirmar esta hipótesis llevamos a cabo experimentos de co-inmunoprecipitación de GRK2 y Mdm2 en presencia de cantidades crecientes de β-arrestinas-1 o -2 (fig 13, panel A y B). Así, observamos que con la sobreexpresión creciente de β-arrestina-1 ó -2, la presencia de GRK2 en los complejos inmunoprecipitados de Mdm2 disminuye progresivamente.

Asimismo, observamos que la expresión de β-arrestina-1 V53D es más efectiva en disminuir la asociación de GRK2 con Mdm2 que la proteína nativa (figura 14A). Dado que β-arrestina-2 V54D no se asocia a Mdm2, este mutante no se espera que compita con GRK2 por la unión a Mdm2. Por tanto, el carácter “dominante negativo” de β-arrestina-1 V53D reside en su habilidad para retener o secuestrar Mdm2, limitando la disponibilidad de la ligasa para GRK2. De acuerdo con este modelo, observamos que la sobreexpresión de Mdm2 reestablece la degradación de GRK2 en presencia de β-arrestina-1 V53D (fig 14B), probablemente como consecuencia de la existencia de un exceso de ligasa no unida al mutante. Todos estos datos sugieren que β-arrestina sería importante como molécula adaptadora para situar a Mdm2 cerca de GRK2 tras la estimulación de receptores, pero una vez localizada en las inmediaciones de los GPCRs es indispensable la liberación de Mdm2 de las β-arrestinas para la asociación de la ligasa a GRK2.

Con objeto de confirmar la competencia entre β-arrestina y GRK2 por la asociación a Mdm2 realizamos ensayos de interacción de proteínas “in vitro” con GRK2 recombinante y GST-Mdm2 en presencia o ausencia de β-arrestina purificada. Estos ensayos muestran que GRK2 y Mdm2 pueden unirse de manera directa sin necesidad de adaptadores (fig 15A), siendo prescindibles para dicha interacción los 100 primeros aminoácidos de Mdm2, que comprenden el dominio de unión a p53 responsable de inhibir la transactivación de este factor (datos no mostrados). Curiosamente, β-arrestinas interac-





**Figura 13:** La expresión de  $\beta$ -arrestina desplaza a GRK2 de su asociación con Mdm2 de manera dependiente de dosis.

Las células HEK-293 co-transfectadas con GRK2 y Mdm2 en presencia de cantidades crecientes de  $\beta$ -arrestina-1 (**panel A**) o  $\beta$ -arrestina-2 (**panel B**), se lisaron para su posterior inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Mdm2 (SMP14). Las proteínas Mdm2 y GRK2 presentes en los inmunocomplejos obtenidos se analizaron mediante inmunodetección.

cionan directamente con la mitad C-terminal de la ligasa (región mínima aminoácidos 383-410) (ver esquema en Introducción, fig XII), por lo que la unión de GRK2 a Mdm2 podría modular la interacción con  $\beta$ -arrestina y viceversa. De hecho, la adición de  $\beta$ -arrestina recombinante desplaza a GRK2 de GST-Mdm2 (fig 15B), en línea con los resultados obtenidos “in situ” anteriormente.

Estas observaciones refuerzan la idea de que GRK2, Mdm2 y  $\beta$ -arrestina no se encuentran simultáneamente en el mismo complejo macromolecular. En este sentido, se ha descrito recientemente la existencia de complejos citosólicos  $\beta$ -arrestina/ Mdm2 en condiciones basales, en los que la actividad de la ligasa permanecería silente para determinados sustratos (Gurevich, 2007). Todas estas observaciones sugieren que la estimulación de receptores no sólo aumenta la concentración local de Mdm2 asociada a  $\beta$ -arrestina en las proximidades del receptor activado, sino que además debe promover la transferencia de la ligasa activa entre  $\beta$ -arrestinas y GRK2. En condiciones de no estimulación, GRK2 po-

dría interactuar con un “pool” de Mdm2 no unido a  $\beta$ -arrestinas que probablemente contribuiría a mantener el reciclaje basal de la quinasa. Si esta hipótesis es correcta, la ausencia de  $\beta$ -arrestinas favorecería la asociación de GRK2 y Mdm2. En efecto, experimentos de co-inmunoprecipitación de la quinasa y la ligasa endógenas revelan una mayor asociación basal de estas proteínas en células MEFs que carecen de  $\beta$ -arrestina 1 y 2 comparado con células MEFs de tipo salvaje (fig 16A).

Sin embargo, a pesar de la mayor disponibilidad de Mdm2 para interactuar con GRK2 en células MEFs nulas para  $\beta$ -arrestinas, la degradación de GRK2 está sensiblemente dificultada en estas células, como hemos demostrado anteriormente (fig 3). Es posible que

el complemento celular de la ligasa en estas células sea insuficiente o funcionalmente defectivo para mantener una tasa normal de reciclaje en GRK2. En este sentido, parece detectarse una menor presencia de Mdm2 en los inmunoprecipitados obtenidos a partir de células MEFs carentes de  $\beta$ -arrestinas (fig 16 A). Alternativamente, la ausencia de  $\beta$ -arrestinas puede impedir otros procesos que contribuyen a la degradación de GRK2, independientemente de Mdm2. De hecho,  $\beta$ -arrestinas actúan como adaptadores de otras actividades ligasas distintas de Mdm2 (Shenoy, 2001), que podrían modular la estabilidad de GRK2. En coherencia con esta posibilidad, en células MEFs nulas para la ligasa Mdm2, en las que se observaba una reducción notable de la ubiquitilación y reciclaje de GRK2 ( $\pm 80\%$  de GRK2 remanente a las 2 horas de caza), la expresión exógena de  $\beta$ -arrestina 1 restaura la degradación de GRK2 ( $\pm 40\%$  de GRK2 remanente a las 2 horas de caza) (fig 16B).

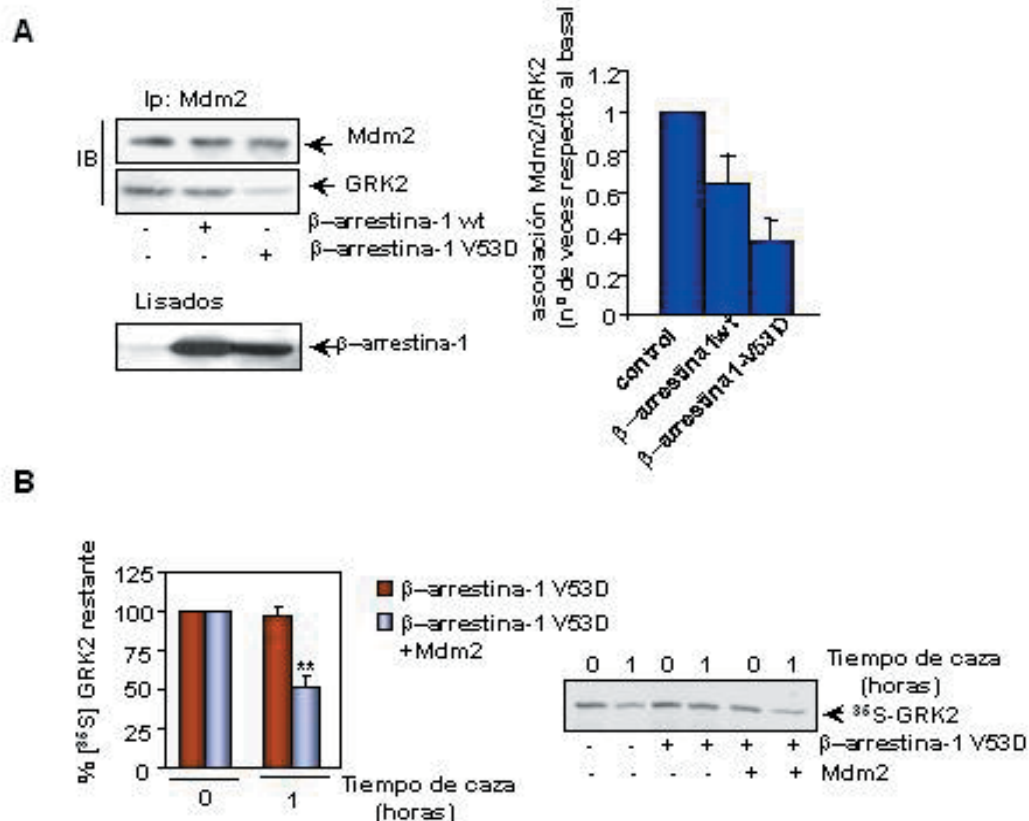


Figura 14: El efecto inhibitor de β-arrestina-1 V53D en la degradación de GRK2 se rescata con la sobreexpresión de Mdm2.

**A)** Asociación de Mdm2 y GRK2 exógenas en presencia de β-arrestina-1 o del mutante β-arrestina-1 V53D transfectadas en células HEK-293 obtenida tras la lisis e inmunoprecipitación.

**B)** Células HEK-293 transitoriamente co-transfectadas con GRK2 y β-arrestina-1 V53D en presencia y ausencia de Mdm2, se marcaron metabólicamente con <sup>35</sup>S-metionina y posteriormente se analizó la degradación de GRK2 tal y como se detalla en Materiales y Métodos.

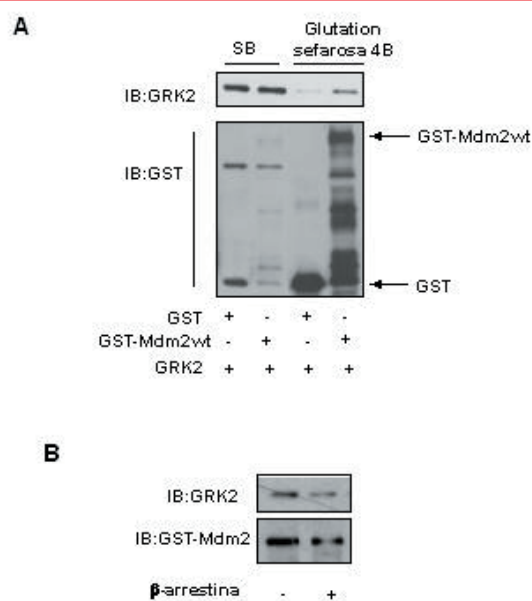
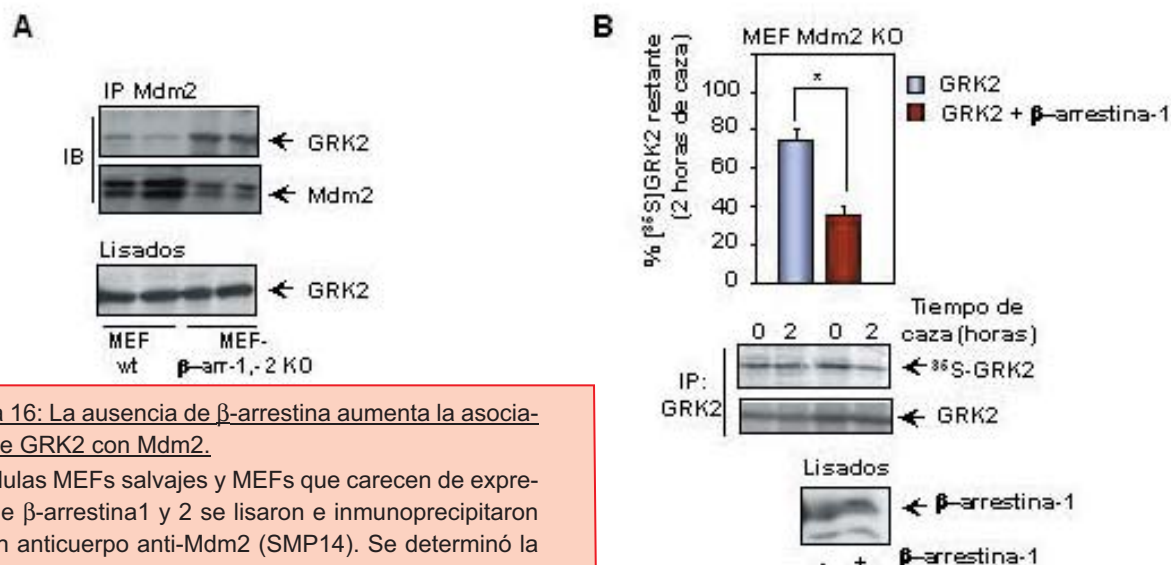


Figura 15: GRK2 y Mdm2 se asocian "in vitro" de forma directa.

Estudio de la asociación Mdm2/ GRK2 mediante experimentos "in vitro" donde la proteína GRK2 recombinante se incubó con la proteína purificada GST-Mdm2 en ausencia (**panel A**) o en presencia de β-arrestina recombinante (**panel B**). La unión de GRK2 a Mdm2 se determinó mediante inmunodetección de la quinasa asociada a GST-Mdm2 inmovilizada en la resina Glutathion-S Sepharose tal y como se indica en Materiales y Métodos.





**Figura 16:** La ausencia de  $\beta$ -arrestina aumenta la asociación de GRK2 con Mdm2.

**A)** Células MEFs salvajes y MEFs que carecen de expresión de  $\beta$ -arrestina1 y 2 se lisaron e inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-Mdm2 (SMP14). Se determinó la cantidad de GRK2 presente en el complejo de inmunoprecipitación mediante inmunodetección con anticuerpos específicos.

**B)**  $\beta$ -arrestina-1 también promueve la degradación de GRK2 por mecanismos independientes de Mdm2. La degradación de GRK2 exógena en presencia o ausencia

de  $\beta$ -arrestina-1 sobreexpresada en células MEFs que carecen de Mdm2 se determinó mediante experimentos de pulso y caza. Se representa la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes,  $*p < 0.05$ . Se muestran geles representativos.

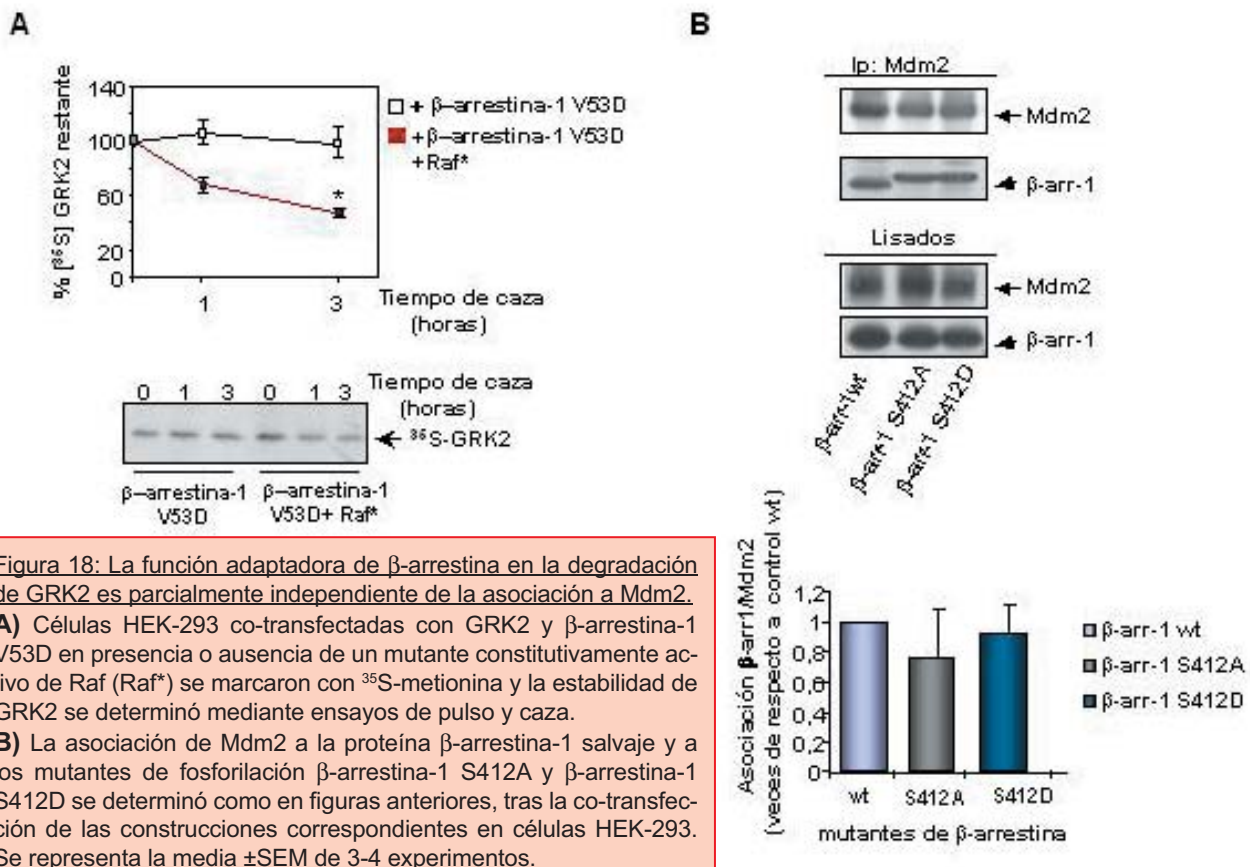
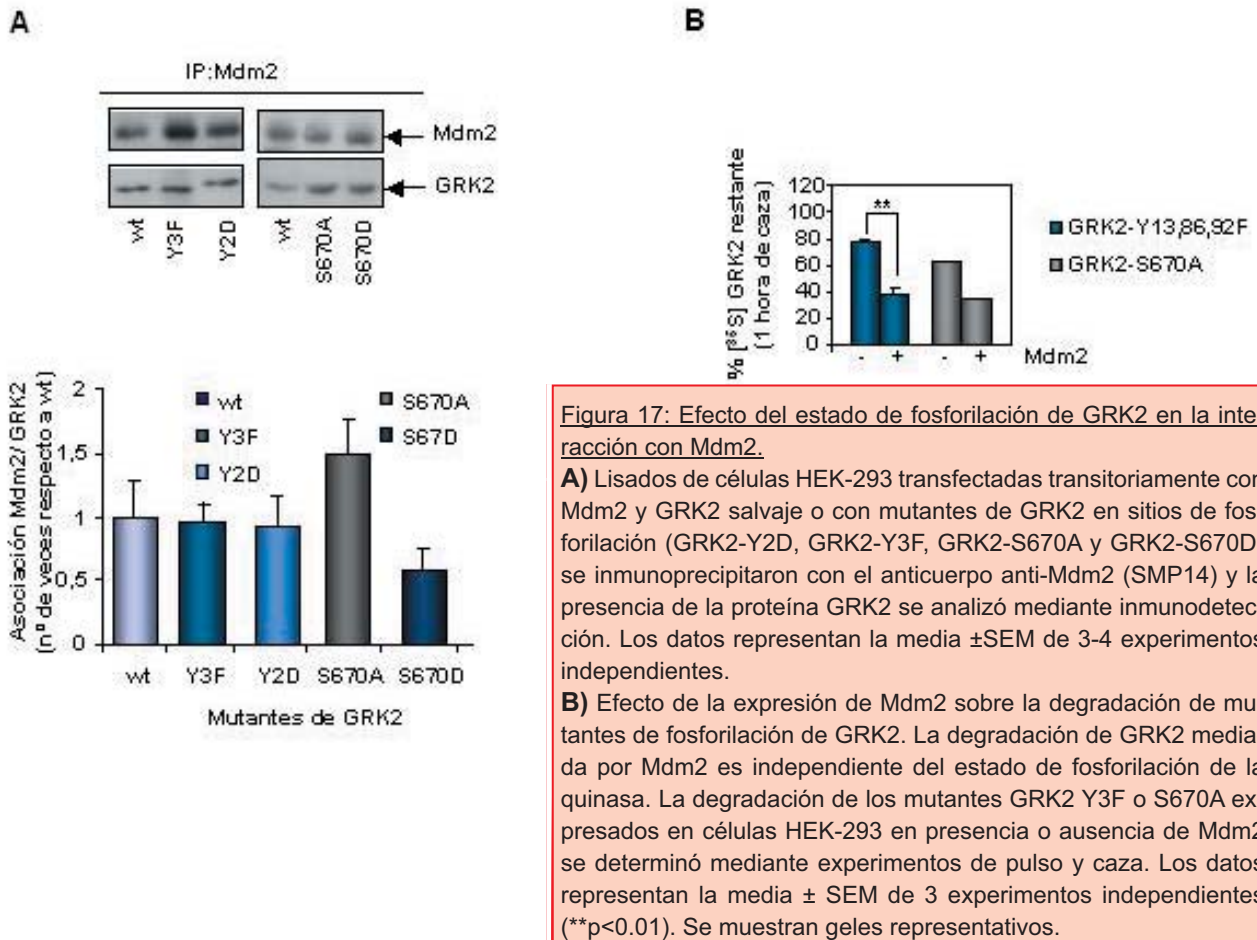
En conjunto, podemos concluir que  $\beta$ -arrestinas desempeñan un papel central en la modulación de la estabilidad de GRK2, facilitando la modificación de la proteína por varias quinasas y coordinando la acción de varias ligasas, entre las cuales se halla Mdm2, en respuesta a la activación de diferentes receptores de membrana.

### 2.3.- La fosforilación de GRK2 por c-Src o ERK no modula la degradación dependiente de Mdm2.

La ubiquitilación es, en general, un paso muy regulado en el que frecuentemente la fosforilación de las proteínas sustrato constituye la señal de reconocimiento (fosfodegrones) de ligasas específicas, o bien permite la redistribución del sustrato para su colocalización con la ligasa. Dado que la fosforilación de GRK2 por c-Src y ERK aumenta la degradación de GRK2 (Elorza, 2000; Penela, 2001), nos planteamos analizar si estas modificaciones promovidas por la estimulación de GPCRs constituían una señal de reconocimiento para la ligasa Mdm2 o bien para otras ligasas reclutadas por  $\beta$ -arrestinas. Para ello, llevamos a cabo experimentos de asociación de Mdm2 y mutantes de GRK2 en residuos de fosforilación de c-Src y MAPK, que mimetizaban bien el estado permanentemente fosforilado de la quinasa (GRK2-S670D, GRK2 Y2D), bien el estado no fosforilado (GRK2-S670A, GRK2-Y3F).

Tal y como se muestra en la figura 17 A, Mdm2 no se asocia de modo significativamente diferente a ninguno de los mutantes de fosforilación de GRK2 analizados, sugiriendo que la fosforilación de GRK2 no modifica el reconocimiento de la proteína por Mdm2. Sin embargo, los mutantes de GRK2 defectivos en fosforilación sí mostraban una menor tasa de degradación. Así, GRK2 Y13/86/92F tiene una vida media aproximadamente tres veces superior a la de GRK2 salvaje y no se modula por la estimulación de receptores GPCRs (Penela, 2001), mientras que GRK2 S670A presenta alteraciones en la degradación en condiciones de estimulación de receptores (Elorza, 2003). Dado que Mdm2 parece unirse eficientemente a estos mutantes, analizamos si la sobreexpresión de la ligasa tenía algún efecto en su patrón de degradación. Como se observa en la figura 17 B, la presencia exógena de la ligasa aumenta la degradación de GRK2 S670A y restaura la de GRK2 Y3F hasta niveles similares a los de GRK2 salvaje tras una hora de caza. Estos resultados sugieren que Mdm2 actúa en paralelo e independientemente de las cascadas de fosforilación que modulan la estabilidad de GRK2.

En este contexto,  $\beta$ -arrestina tendría una doble implicación en la degradación de GRK2, y su función "proteolítica" dependiente de Mdm2 podría desacoplarse de la dependiente de c-Src y ERK. Así, los mutantes de  $\beta$ -arrestina que interfirieran con una u otra función, tendrían efectos parciales de bloqueo en el reciclaje de GRK2, mientras que aquellos mutantes que alteraran



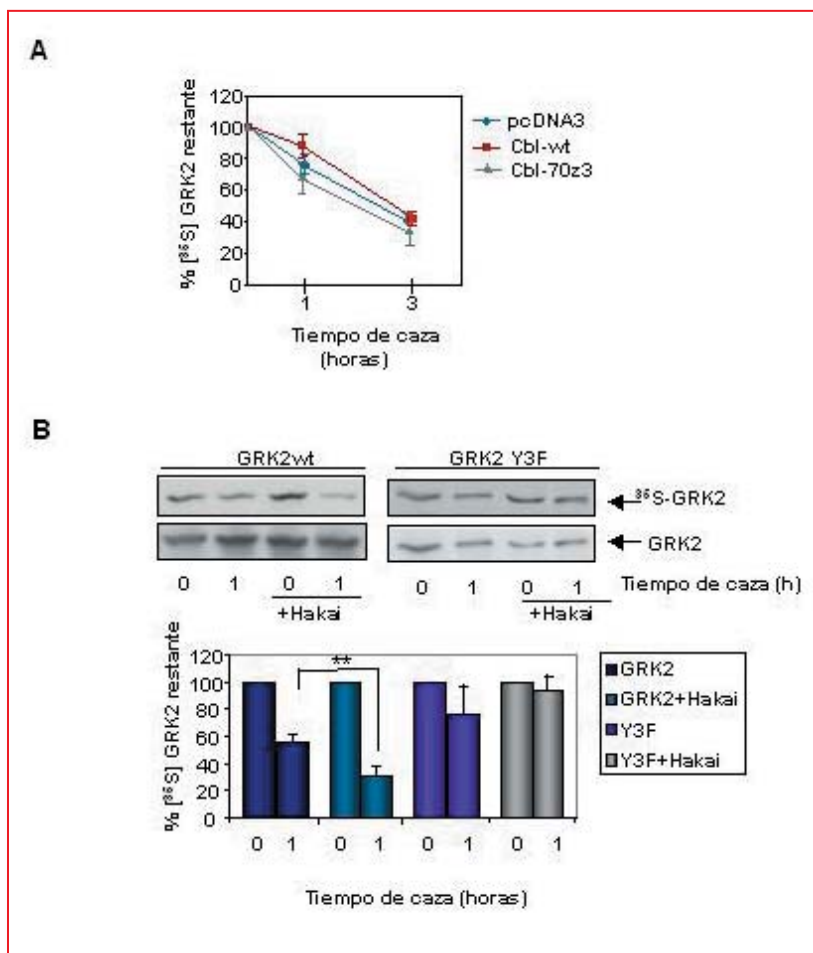


Figura 19: La ligasa Hakai modula la degradación de GRK2 de manera dependiente del estado de fosforilación de la quinasa.

**A)** Degradación de GRK2 en presencia de la ligasa de tipo RING finger Cbl salvaje y de un mutante constitutivamente activo, Cbl-70z3, en células HEK-293, determinada mediante experimentos de pulso y caza.

**B)** Células HEK-293 transitoriamente transfectadas con GRK2 salvaje o el mutante GRK2-Y3F se marcaron con  $^{35}\text{S}$ -metionina para estudiar la degradación de la quinasa en presencia o ausencia de la ligasa Hakai. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes (\*\* $p < 0.01$ ). Se muestran geles representativos.

a otros mutantes de  $\beta$ -arrestina, que también alteraban la degradación de GRK2. Así, habíamos descrito con anterioridad que la expresión del mutante de  $\beta$ -arrestina-1 S412D bloqueaba la degradación de GRK2 en respuesta a estímulos de GPCRs (Penela, 2001), como consecuencia de su incapacidad para reclutar c-Src y promover la fosforilación en tirosinas de GRK2. Por el contrario,

$\beta$ -arrestina S412A, que une eficientemente c-Src, no tenía efecto en la degradación de GRK2. Como se observa en la figura 18 B, Mdm2 se asocia de la misma manera a  $\beta$ -arrestina S412D y  $\beta$ -arrestina S412A, e igual que a la proteína de  $\beta$ -arrestina salvaje, indicando de nuevo que el componente de degradación de GRK2 dependiente de Mdm2 sería independiente de la capacidad de  $\beta$ -arrestina de atraer a c-Src y de promover la fosforilación de la quinasa.

#### 2.4.- Identificación de ligasas implicadas en modular la estabilidad de GRK2 dependientes de fosforilación.

En resumen, y de acuerdo con los resultados anteriormente expuestos, podemos concluir que Mdm2 es una ligasa clave en la regulación de la estabilidad de GRK2, que actúa de manera independiente de las señales de fosforilación de GRK2 promovidas por c-Src y MAPK. Estas modificaciones de la quinasa dirigen la degradación de GRK2 en respuesta a estímulos de GPCRs, sumándose probablemente al componente de degradación dependiente de Mdm2. Es posible, por tanto, que las señales de fosforilación de

ambas funciones adaptadoras promoverían un efecto más acusado. Este es el caso de la mutación V53D de  $\beta$ -arrestina-1, que inhibe fuertemente la degradación de GRK2 como resultado de su unión aberrante a Mdm2 y su incapacidad de reclutar a c-Src y ERK al complejo del receptor para facilitar la fosforilación de GRK2. En relación con este punto, hemos demostrado que la sobreexpresión de Mdm2 permitía rescatar la falta de degradación de GRK2 inducida por la mutación V53D (fig 14B). De manera similar, observamos que la sobreexpresión de un mutante constitutivamente activo de Raf (Raf\*) también rescata, aunque sólo parcialmente, la degradación de GRK2 en presencia de  $\beta$ -arrestina-1 V53D, obteniéndose una vida media de GRK2 de tres horas frente a la de una hora en condiciones normales (Fig 18 A). Hemos demostrado con anterioridad que la expresión de Raf\* promueve directamente la activación del módulo MEK/ ERK y la fosforilación de GRK2, prescindiendo de la función adaptadora de  $\beta$ -arrestina en este proceso. GRK2 así modificada es dirigida a degradación por el proteasoma (Elorza, 2003). Por tanto, la proteólisis de GRK2 en presencia de  $\beta$ -arrestina-1 V53D y Raf\* se debería a la degradación de GRK2 dependiente de la fosforilación por MAPK.

Con objeto de confirmar estos resultados, estudiamos la capacidad de asociación de Mdm2



GRK2 atraigan a otras ligasas. En este sentido,  $\beta$ -arrestina se asocia a otras actividades ligasas distintas de Mdm2 (Shenoy, 2001), lo que explicaría que su sobreexpresión restaure la degradación de GRK2 en células que carecen de Mdm2, tal y como hemos demostrado (fig 16B).

Con el fin de identificar potenciales ligasas que pudieran participar en la degradación de GRK2 dependiente de fosforilación, analizamos el efecto de Hakai y Cbl (Fujita, 2002), ligasas conocidas que reconocen en sus sustratos degrados fosforilados en tirosinas. La expresión de Cbl salvaje o de un mutante de Cbl constitutivamente activo (Cbl 70z3) en células HEK-293 co-transfectadas con GRK2 no ejerce ningún efecto sobre la estabilidad de la quinasa (fig 19A). Sin embargo, como se muestra en la figura 19B, la degradación de GRK2 se ve aumentada de manera significativa en presencia de Hakai ( $55 \pm 6\%$  de GRK2 remanente tras una hora de caza y  $30 \pm 7\%$  en ausencia o en presencia de Hakai, respectivamente). El efecto de Hakai en la estabilidad de GRK2 es dependiente de la fosforilación en tirosinas de la proteína, ya que la ligasa no es capaz de aumentar la degradación de GRK2 Y13/86/92 F, mutante que carece de los sitios de fosforilación por c-Src y que muestra una degradación muy retardada ( $76\%$  de proteína remanente tras una hora de caza) (fig 19B).

### 3.- REGULACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE GRK2 POR EL RECEPTOR DE IGF-1.

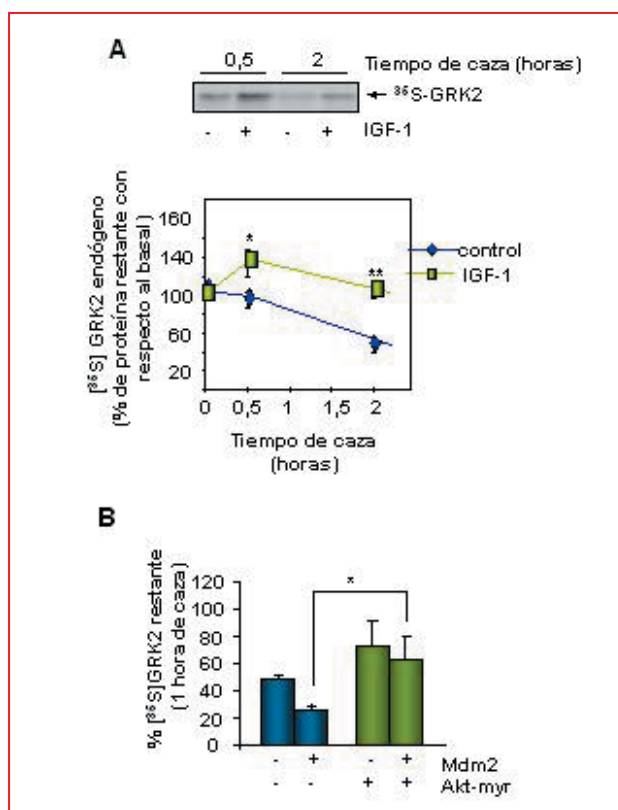
#### 3.1.- La estabilidad de GRK2 está regulada por la señalización de IGF-1.

En el apartado anterior hemos demostrado que GRK2 se ubiquitila y degrada de manera dependiente de Mdm2 y de la estimulación de GPCRs como el  $\beta$ 2-AR, que promueve un rápido reciclaje de la quinasa a través de  $\beta$ -arrestinas, las cuales facilitan por un lado la interacción entre GRK2 y Mdm2, y por otro lado la fosforilación de GRK2 y su reconocimiento por otras ligasas como Hakai.

Recientemente, se ha descrito que los complejos de  $\beta$ -arrestina y Mdm2 son también reclutados a las inmediaciones de otros receptores activados distintos de los GPCRs, como es el caso del receptor de IGF-1 (Guirrita, 2005). Este reclutamiento de Mdm2 al IGF-1R promueve la degradación de distintos sustratos, incluido

el propio receptor. En base a estos antecedentes, nos planteamos determinar si la activación del receptor de IGF-1 tenía algún efecto en la estabilidad de GRK2.

Así, analizamos la degradación de GRK2 mediante experimentos de pulso y caza en células de carcinoma de mama MCF-7, que expresan endógenamente el receptor IGF-1R. En condiciones basales la vida media de GRK2 en MCF-7 es similar a la que presenta la quinasa en otros tipos celulares (datos no mostrados). Dado que la estimulación con IGF-1 podría estar enmascarada por los distintos componentes



**Figura 20:** La estimulación del receptor de IGF-1 retrasa la degradación de GRK2

**A)** El recambio de GRK2 endógeno en células MCF-7 en presencia de 50ng/ml de IGF-1 o placebo, se analizó tal y como se detalla en Materiales y Métodos. Las proteínas marcadas con  $^{35}$ S-metionina se inmunoprecipitaron con un anticuerpo específico anti-GRK2 (C5/1.1). La densidad de las bandas de GRK2 marcada ( $^{35}$ S-GRK2) durante el periodo de pulso (0 horas) se consideró como el 100%. Se representan las medias  $\pm$  SEM de 4 experimentos. \* $p < 0,05$ .

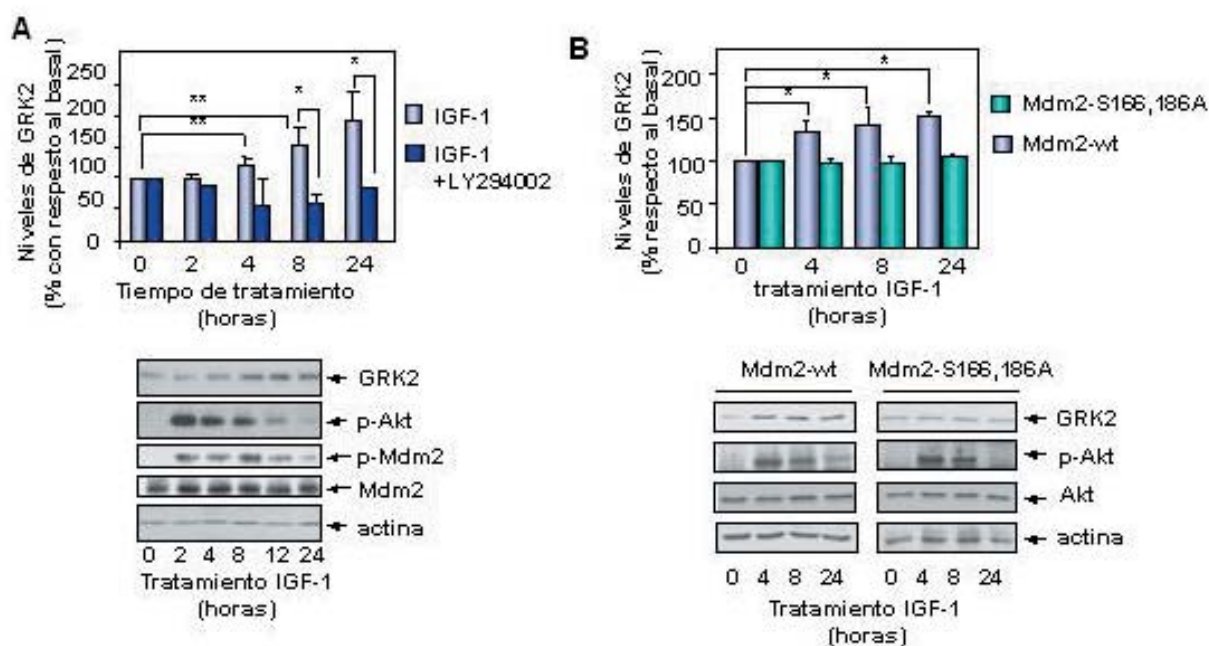
**B)** Las células HEK-293 se transfectaron con diferentes combinaciones de GRK2, Mdm2 y un mutante de Akt constitutivamente activo (Akt-myr). La tasa de degradación de GRK2 se determinó mediante experimentos de pulso y caza. Los resultados mostrados proceden de la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$ , comparando los datos control frente a los tratados con IGF-1 durante 0,5 y 2 horas, respectivamente.

tróficos del medio de cultivo, las células se mantuvieron privadas de suero en los ensayos de degradación, tras comprobar que estas condiciones no modificaban “per se” la estabilidad de GRK2 durante los periodos de caza analizados.

Sorprendentemente, la degradación de GRK2 se atenuaba en condiciones de estimulación de IGF-1 en comparación con las condiciones control (fig 20A). Así, la disminución de los niveles de la proteína GRK2 en el periodo de caza de 30 minutos es de 2,3 veces en las células no tratadas, mientras que en las células estimuladas esta disminución es sólo de 1,3 veces. Estos datos podrían sugerir que la modulación por IGF-1 rinde complejos  $\beta$ -arrestina/ Mdm2 no competentes en promover la degradación de GRK2. En este sentido, recientemente varios grupos han descrito que AKT es capaz de unirse a Mdm2, fosforilar a la ligasa y promover así su localización nuclear en respuesta a IGF-1 (Mayo, L, 2001, Feng, 2004). Así pues, planteamos la hi-

pótesis de que la fosforilación de Mdm2 por AKT en respuesta a IGF-1 podía estar impidiendo la degradación de GRK2.

Para verificar esta hipótesis realizamos experimentos de pulso y caza en células HEK-293 transfectadas transitoriamente con GRK2, en presencia y en ausencia de Mdm2 y de un mutante constitutivamente activo de AKT (AKTmyr). Como se aprecia en la figura 20 B, la degradación de GRK2 se inhibe por la actividad de AKT, obteniéndose valores del  $74 \pm 8\%$  de proteína GRK2 remanente en presencia de AKTmyr comparado con  $49 \pm 3\%$  en condiciones control. Asimismo, la expresión del mutante de AKT causa un cambio dramático en la proteólisis promovida por Mdm2 ( $63 \pm 15\%$  de proteína GRK2 restante tras 1 hora de caza comparado con un  $26 \pm 3\%$  en presencia de Mdm2 con y sin AKTmyr, respectivamente) (fig 20B). Esto sugería que la activación de AKT por IGF-1 previene el efecto de Mdm2 sobre GRK2, promoviendo la estabilización de la quinasa.



**Figura 21:** Los niveles de GRK2 aumentan progresivamente con la estimulación prolongada de los receptores de IGF-1.

**A)** La estimulación con IGF-1 induce la acumulación de GRK2 endógena de manera dependiente de PI3K. Células MCF7 se mantuvieron en ausencia de suero durante 12 horas y se estimularon con IGF-1 (50ng/ml) durante los tiempos indicados en presencia y ausencia del inhibidor de PI3K, LY294002 (10 $\mu$ M). Las células se sometieron a análisis por inmunoblot con los anticuerpos anti-GRK2, anti-Akt-pSer473, anti-Mdm2-pSer166 y anti-Mdm2. Las densidades de las bandas de GRK2 se normalizaron con los niveles de proteína actina y se expresaron como porcentaje del nivel de GRK2 en condiciones de no estimulación (100%). Los datos son la media  $\pm$  SEM de 5 experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

**B)** La regulación positiva que ejerce IGF-1 sobre los niveles de GRK2 se impide con la expresión de un mutante de Mdm2 incapaz de ser fosforilado por Akt. Células MCF7 transfectadas transitoriamente bien con la proteína Mdm2 salvaje o bien con el mutante Mdm2-S166A-186A, se mantuvieron en condiciones libres de suero durante 12 horas y se estimularon con IGF-1 (50ng/ml) durante los tiempos indicados. Los niveles de expresión de GRK2, Akt-pSer473, Akt y actina se determinan por inmunodetección con anticuerpos específicos. Los datos densitométricos y los porcentajes de los niveles de proteína GRK2 se calcularon de la misma manera que en el panel A. Se muestran geles representativos.

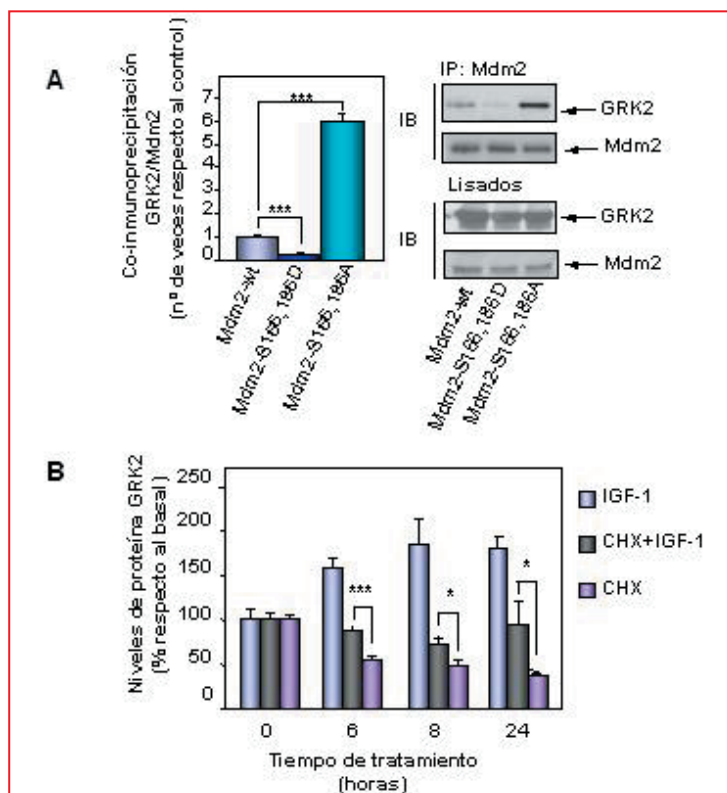
### 3.2.- La regulación de la expresión de GRK2 por IGF-1 implica a la vía PI3K/ AKT/ Mdm2, debiéndose exclusivamente a cambios en la degradación y no en la síntesis de la proteína GRK2.

De acuerdo con los resultados anteriores, observamos que los niveles endógenos de la proteína GRK2 en células MCF-7 se incrementan de manera progresiva tras el tratamiento con IGF-1 (fig 21A). El aumento de GRK2 es significativo a partir de las 4 horas de incubación con IGF-1 y alcanza a duplicar los valores iniciales de expresión tras 24 horas de tratamiento. En paralelo a la acumulación de la proteína GRK2, IGF-1 promueve también la activación de AKT y la fosforilación de Mdm2 en los sitios descritos para AKT, tal y como detectamos con un anticuerpo específico de Mdm2 fosforilada en la serina 166.

Es importante destacar que el pico de activación de AKT es coincidente con el inicio de la fosforilación de Mdm2 y que estas modificaciones preceden los cambios en los niveles de GRK2. Todo ello sugería que la modificación de Mdm2 por la vía de PI3K/AKT inducida por IGF-1 de algún modo bloquea la función ligasa de Mdm2 sobre GRK2, estabilizando a la proteína. De acuerdo con esta hipótesis, observamos que la inhibición farmacológica de PI3K, a la vez que bloquea la activación de AKT y la fosforilación de Mdm2 (fig 21A), impide el incremento de los niveles de GRK2.

Con el fin de explorar si la fosforilación de Mdm2 por AKT es suficiente para prevenir la degradación de GRK2 o se requieren eventos adicionales dependientes de IGF-1 para este proceso, determinamos el efecto de la expresión de un mutante de Mdm2 incapaz de ser fosforilado por AKT (Mdm2 S166,186A) en los niveles de GRK2 endógenos en células MCF-7. En estas condiciones GRK2 no se acumula en respuesta a IGF-1, a pesar de que AKT se active igual que en células que sobreexpresan Mdm2 salvaje (fig 21B). Por tanto, el estado de fosforilación de Mdm2 parece modular directamente la estabilidad de la quinasa, bien dificultando la interacción de ambas proteínas, bien modificando la actividad ligasa de modo selectivo para GRK2. Para discriminar entre estas posibilidades se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación de GRK2 y mutantes de Mdm2 defectivos en los sitios de fosforilación de AKT (S166A,186A) o que imitaban estas modificaciones (S166,186D). Como se demuestra en la figura 22A, Mdm2-S166A-186A presenta una mayor asociación a GRK2 comparado con Mdm2 salvaje, mientras que el mutante Mdm2-S166D-186D interacciona muy pobremente con la quinasa. Esta asociación diferencial de Mdm2 fosforilada por AKT con GRK2 tendría como efecto inmediato la reducción de la tasa de degradación de GRK2.

Con objeto de confirmar este punto y descartar posibles alteraciones en la síntesis de la proteína GRK2 en el efecto observado de IGF-1 sobre sus niveles, las células MCF-7 se trataron con IGF-1 en presencia del inhibidor de síntesis de proteínas, cicloheximida. En la figura 22 B se observa que la cantidad de GRK2



**Figura 22: La fosforilación de Mdm2 por AKT modula su asociación con GRK2.**

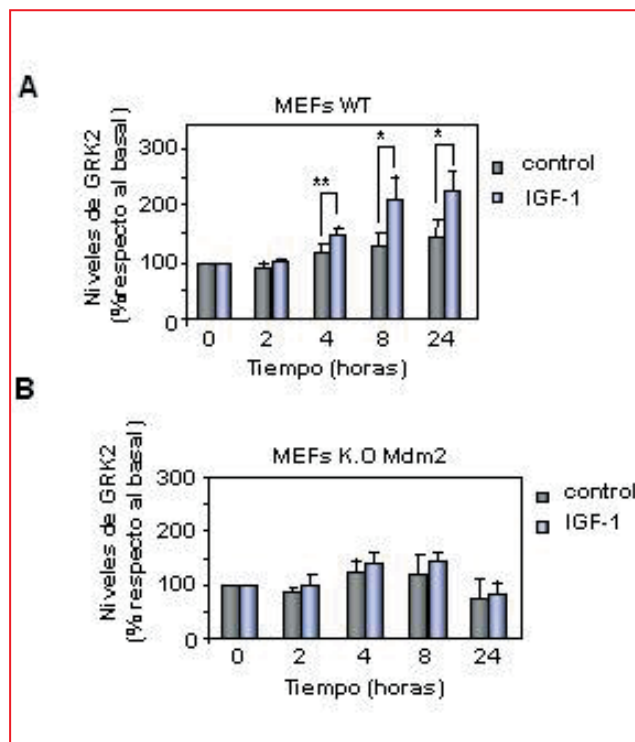
**A)** Células HEK-293 se transfirieron con GRK2 y la proteína Mdm2 salvaje o con los mutantes de la ligasa en los sitios de fosforilación por Akt (Mdm2-S166A-186A o Mdm2-S166D-186D). La asociación entre Mdm2 y GRK2 se determinó tal y como se ha descrito en figuras anteriores. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes. \*\*\* $p < 0.001$  con respecto a la asociación de GRK2 con Mdm2 salvaje. Se muestran autorradiografías representativas.

**B)** Los niveles de proteína de GRK2 endógena se determinaron por inmunodetección de lisados de células MCF7 estimuladas o no con IGF-1 tanto en presencia como en ausencia de cicloheximida. Los datos proceden de la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .



en la célula disminuye progresivamente cuando se bloquea su síntesis como resultado de su proteólisis basal, mientras que IGF-1 promueve la acumulación de GRK2 incluso en presencia de CHX.

Estos resultados indican claramente que la estabilización dependiente de IGF-1 no requiere de la síntesis de nueva proteína GRK2 ni de ningún factor previo. Por tanto, podemos concluir que la regulación de Mdm2 por AKT tiene consecuencias directas en la unión de la ligasa a GRK2 y en la estabilidad de la quinasa.



**Figura 23: La regulación de los niveles de GRK2 por IGF-1 depende de la presencia de Mdm2.**

MEFs salvajes (**Panel A**) y MEFs carentes de la proteína Mdm2 (**panel B**) se trataron con IGF-1 o su vehículo durante los tiempos indicados. Los niveles endógenos de GRK2 se determinaron mediante inmunodetección con anticuerpos específicos y se normalizaron con la expresión de actina. Los datos son la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

A continuación nos planteamos determinar si Mdm2 era, además de un factor suficiente para promover la estabilización de GRK2 por IGF-1, un factor necesario para que este proceso tuviera lugar. Así, analizamos en fibroblastos embrionarios de ratón que carecen de Mdm2 (MEFs Mdm2 ko) y en células no modificadas genéticamente (MEFs wt), los niveles de GRK2 en presencia y ausencia de IGF-1. La figura 23 A muestra que los niveles de GRK2 en las MEFs wt aumentan de modo similar a lo observado en células MCF-7 en respuesta a IGF-1. Por el contrario, este

efecto de acumulación de GRK2 no se induce en células carentes de Mdm2 (fig 23B), a pesar de que en estas células IGF-1 promueve eficientemente la activación de PI3K/ AKT al igual que en las células control (datos no mostrados). Estos resultados demuestran claramente que la E3 ligasa Mdm2 es el factor clave en la regulación de la estabilidad de GRK2 por IGF-1.

### 3.3.- La regulación de GRK2 por la vía dependiente de PI3K/ AKT es clave en determinar la modulación de los niveles de expresión de GRK2 por Mdm2 en células tumorales.

Hemos demostrado que los niveles de expresión de GRK2 en la línea tumoral de carcinoma de mama MCF-7 están modulados por IGF-1, a través de la fosforilación de Mdm2 por AKT. La señalización de IGF-1 juega un papel importante en la progresión tumoral del epitelio de mama, proporcionando señales proliferativas y de supervivencia en las células transformadas (Larsson, 2005). En este contexto, la regulación de GRK2 por IGF-1 descrita en MCF-7 podría describir un mecanismo común a distintas células transformadas de mama, así como a otras células tumorales con dependencia de vías de señalización conducentes a la activación de AKT. Por tanto, analizamos los niveles de GRK2 en las líneas tumorales de epitelio de mama MDA-MB-468 y de melanoma, B16-F10A (fig 24 A y B), tras la estimulación de IGF-1. En ambos casos, el tratamiento inducía la acumulación de GRK2 precedido por la activación de AKT.

Curiosamente, las células no transformadas MCF-10A también responden a la regulación de los niveles de GRK2 por IGF-1 (fig 24C). La estimulación de la línea epitelial MCF-10A con IGF-1 promovía la activación de AKT y la fosforilación de Mdm2 en paralelo a la acumulación de la proteína GRK2, recapitulando la secuencia de eventos descrita en MCF-7, sugiriendo así el mismo mecanismo de estabilización de la proteína en diferentes tipos celulares. De hecho, la inhibición farmacológica de AKT con el compuesto ML-9, en células MDA-MB468 y en MCF-10A impide el aumento de GRK2 tras la estimulación de IGF-1 (fig 25 A y B). Además, la adición de cicloheximida no bloquea el efecto de IGF-1 sobre los niveles de GRK2 en las células MCF-10A, indicando que la modulación de la quinasa en estas células es post-traducciona l y altera la estabilidad de la proteína (fig 25B).

Estos resultados sugieren que en contextos celulares de transformación maligna, en los que

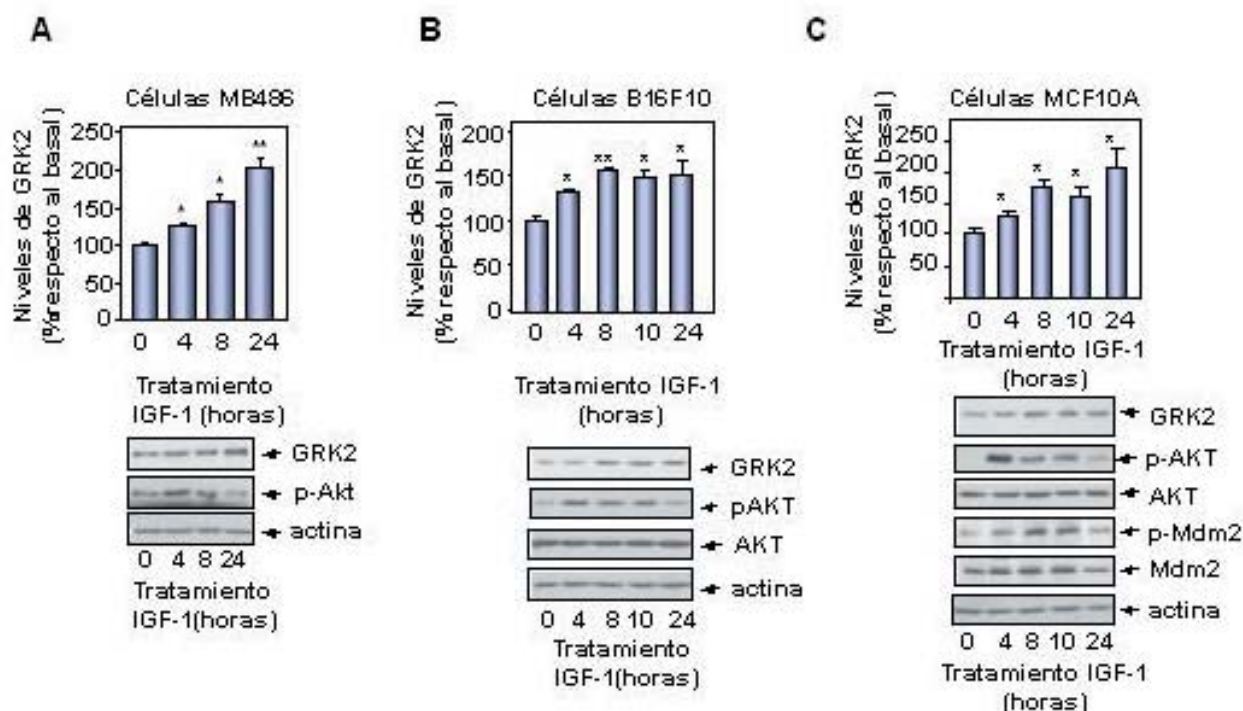


Figura 24: La estimulación con IGF-1 induce la acumulación de la proteína GRK2 en diversas líneas celulares transformadas y no transformadas.

Células de epitelio de mama transformadas MDA-MB-486 (**Panel A**), la línea celular de melanoma B16F10 (**panel B**) y la línea de epitelio de mama no tumoral, MCF-10A (**panel C**) se mantuvieron en condiciones libres de suero durante 12 horas y se estimularon con IGF-1 (50ng/ml) durante los tiempos indicados. Los lisados celulares se analizaron por inmunodetección con anticuerpos anti-GRK2, anti-Akt-pSer473, anti-AKT, anti-Mdm2-pSer166 y anti-actina. El patrón de activación de Akt, la fosforilación de Mdm2 y los niveles de la proteína GRK2 aumentan de una manera similar a la observada en las células MCF7

Las densidades de bandas de GRK2 se normalizaron con los niveles de proteína de actina y se expresaron en porcentaje de niveles de GRK2 respecto a las condiciones sin estimulación. Los datos son la media  $\pm$  SEM de 4-5 experimentos independientes realizados por duplicado. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  cuando se compara con condiciones sin estimulación.

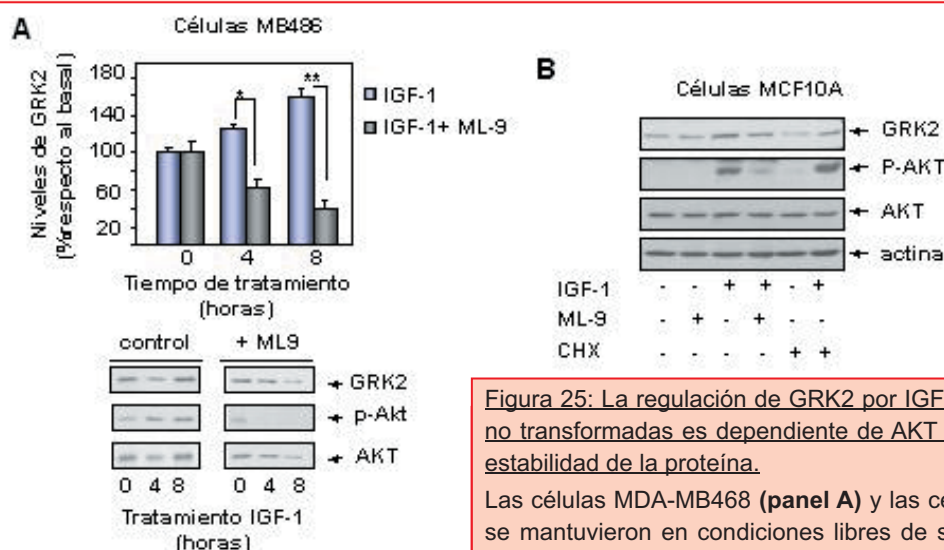


Figura 25: La regulación de GRK2 por IGF-1 en células tumorales y no transformadas es dependiente de AKT y requiere cambios en la estabilidad de la proteína.

Las células MDA-MB486 (**panel A**) y las células MCF10A (**panel B**) se mantuvieron en condiciones libres de suero durante 12 horas y se estimularon con IGF-1 (50ng/ml) en presencia y ausencia del inhibidor de Akt ML9 (50 $\mu$ M) o del inhibidor de la síntesis de proteínas cicloheximida (18 $\mu$ M). Los lisados celulares se sometieron a análisis por inmunodetección con anticuerpos anti-GRK2, anti-Akt-pSer473, anti-Akt y anti-actina. Las densidades de las bandas de GRK2 se normalizaron con los niveles de proteína actina y se expresaron como porcentaje de los niveles de GRK2 detectados en condiciones sin estimulación. Los datos son la media  $\pm$  SEM de 5 experimentos independientes realizados por duplicado. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , cuando se comparan con condiciones de no estimulación. Se muestran geles representativos.

frecuentemente AKT se halla activada y Mdm2 fosforilada y localizada nuclearmente, los niveles de expresión de GRK2 estarían regulados al alza. En línea con esta hipótesis, observamos que los niveles de GRK2 en células mamarias transformadas son mucho mayores que en células normales (fig 26), así como la correlación positiva de estos niveles con el grado de activación de Akt de dichas células. Estas observaciones sugieren la posibilidad de que la expresión de GRK2 pueda ser en determinados contextos un indicador de la transformación neoplásica.

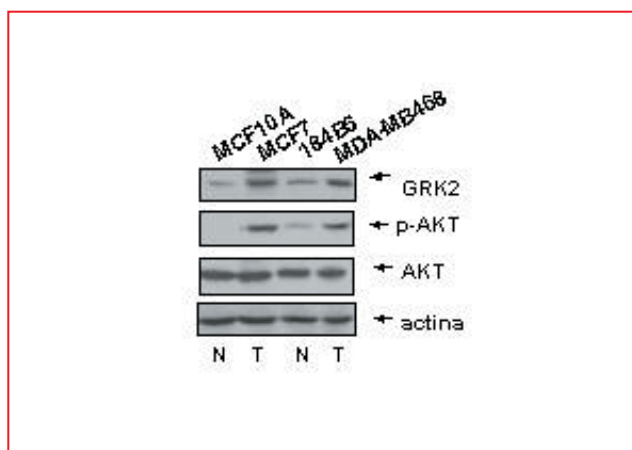
Con el fin de explorar esta posibilidad en un contexto fisiopatológico, se procedió a analizar los niveles de expresión de GRK2 y el grado de activación de AKT en una población de muestras de 27 pacientes afectados de cáncer de mama. Para este estudio, realizado en colaboración con el servicio de Oncología del Hospital Universitario La Paz, dirigido por el Dr. González Barón y con el Dr. David Hardisson del servicio de Anatomía Patológica, se analizaron carcinomas de mama ductales infiltrantes con distintos grados de diferenciación. Como controles se analizaron 12 muestras de tejido mamario no tumorales procedentes de los pacientes examinados. Aunque la expresión de GRK2 en la glándula mamaria de los individuos analizados exhibe en general cierto grado de variabilidad, se puede observar que los niveles detectados por “inmunoblot” son, en promedio, significativamente más bajos en las

de ensayo (fig 27B). De las muestras tumorales analizadas un 40% muestra altos niveles de activación de AKT (muestras Akt positivas) mientras que el 60% muestra igual o menor activación de AKT (muestras Akt negativas y no cambio) que el valor promedio observado en las muestras no tumorales. Dentro de las muestras es posible estratificar la población en función del grado de expresión de GRK2 en términos de mayor, menor o no cambio en comparación con el promedio observado en la población control. Así, en muestras AKT positivas se observa que la distribución estratificada por niveles de GRK2 es: Niveles altos de GRK2 69%, niveles bajos de GRK2 18%. Sin embargo, en las muestras AKT negativas la distribución es: Niveles altos de GRK2 40%, niveles bajos 65%. Estos datos indican una cierta correlación positiva entre el grado de activación de AKT y los niveles de la proteína GRK2 en coherencia con el eje regulador PI3K/ AKT/ Mdm2/ GRK2 que hemos descrito previamente en los sistemas celulares de epitelio transformado de mama. Es más, dentro de las muestras control existen dos pacientes con altos niveles de GRK2 que se alejan del promedio de la población control y que, también muestran una alta activación de AKT.

#### 4.- REPERCUSIONES FUNCIONALES DE LAS VARIACIONES EN LOS NIVELES DE GRK2.

En base a los resultados obtenidos hasta ahora, que muestran la regulación al alza de los niveles de GRK2 tras la activación de AKT en células de carcinoma de mama y en muestras de pacientes con carcinomas de mama positivos para la activación de AKT, nos planteamos determinar si GRK2 era un simple marcador pasivo de la activación de AKT o un factor “activo” en los procesos de transformación celular causados por la sobreestimulación de la vía de PI3K/ AKT.

Esta vía se encuentra amplificada en muchos tipos de cáncer, como los de ovario, páncreas, mama o tiroides. La activación de AKT confiere propiedades oncogénicas ya que regula la progresión del ciclo celular, promueve la supervivencia, inhibe la apoptosis, y estimula la migración e invasividad celular mediante la secreción de metaloproteasas (Park, B. K, 2001; Thant, A., 2000). La presencia de GRK2 podría cooperar con AKT en la regulación de estas funciones celulares o incluso mediar algunos de los efectos de AKT en las mismas. Por tanto, analizamos la capacidad proliferativa de las células, su movilidad y su migración invasiva tras manipular la expresión



**Figura 26: Células transformadas de mama presentan mayores niveles de GRK2.**

Células malignas transformadas (T), MDA-MB486 y MCF-7, y células no transformadas (N), MCF-10A y 184B5 se lisaron y se determinaron los niveles de expresión de GRK2, Akt-pSer473, Akt y actina, como se ha indicado anteriormente. Se muestran paneles representativos de 3 experimentos independientes.

muestras control comparado con las muestras tumorales (fig 27A). Asimismo, la activación de AKT en las muestras no tumorales es casi imperceptible, estando frecuentemente por debajo de los límites de detección de nuestras condiciones



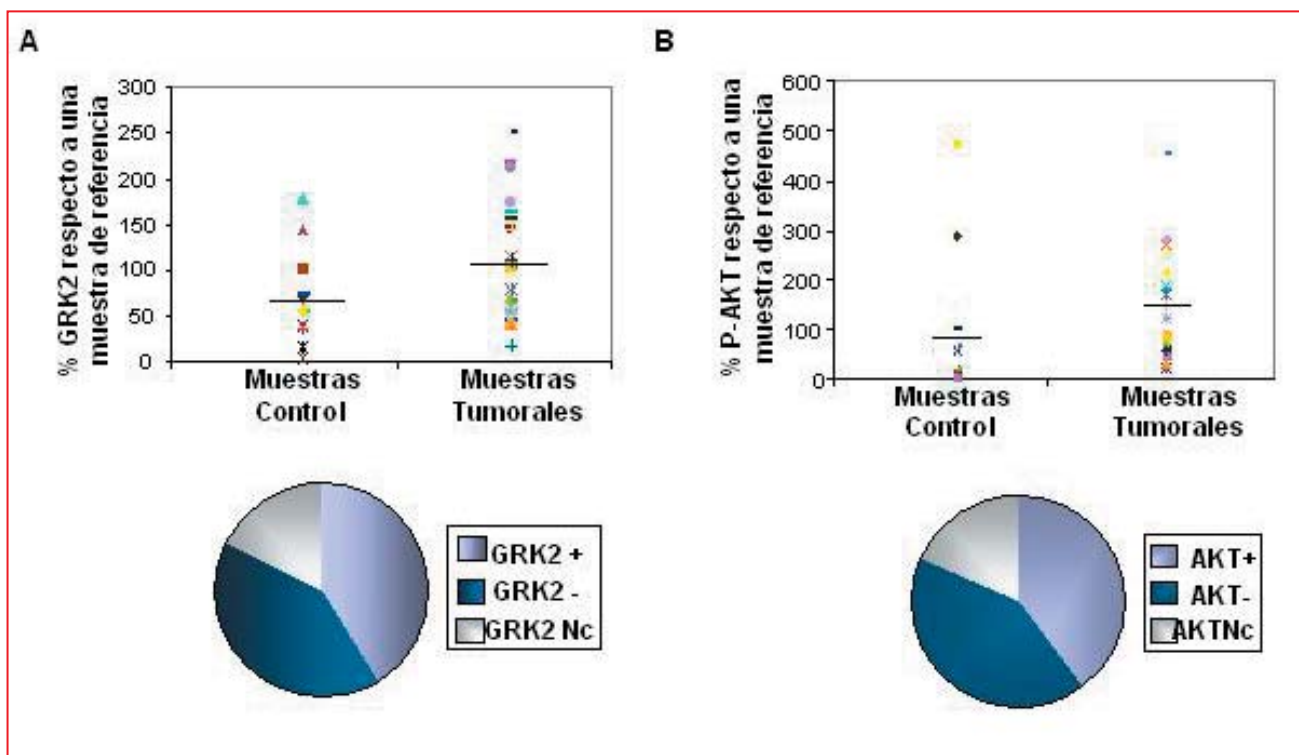
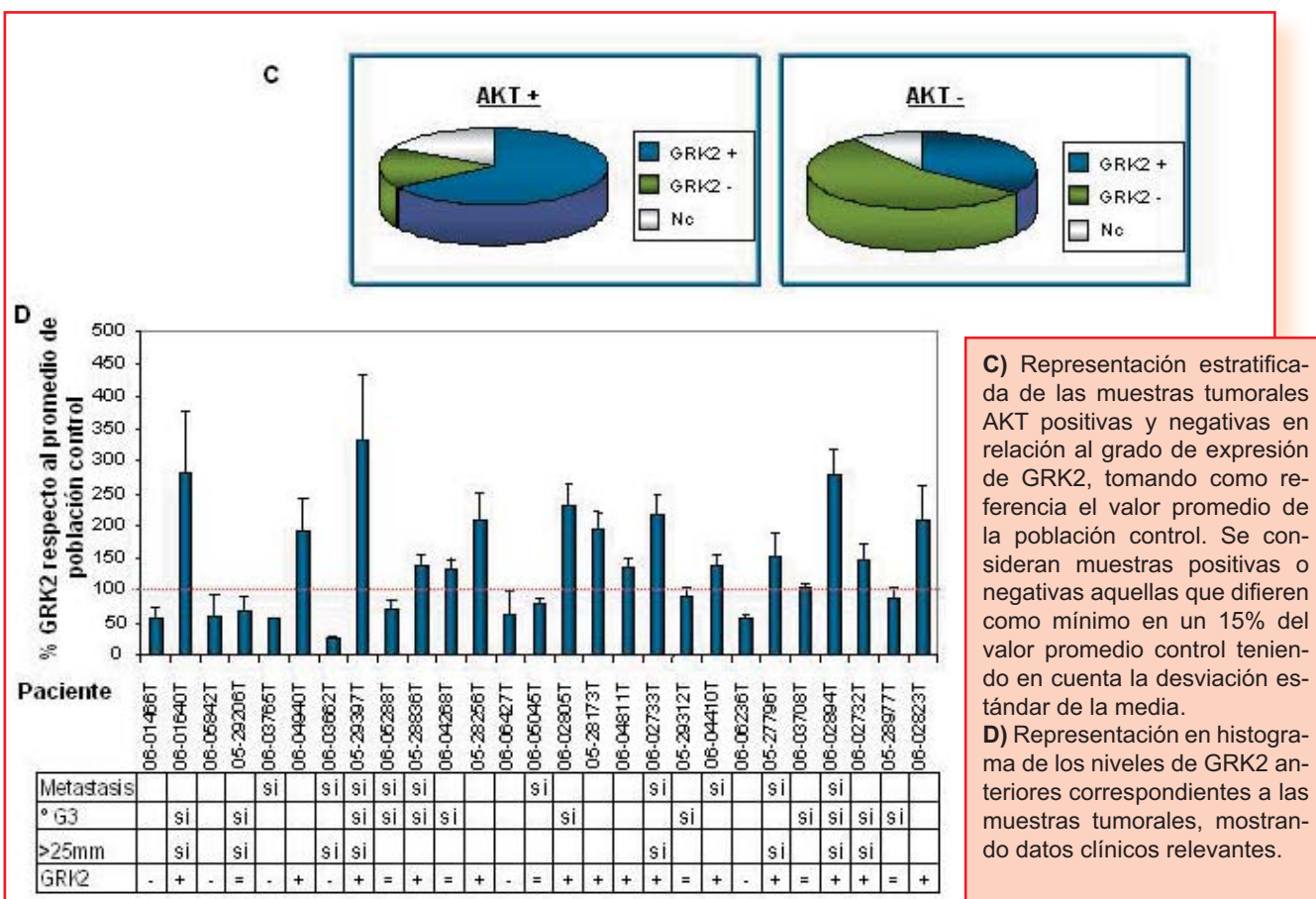


Figura 27: Análisis de los niveles de GRK2 y del estado de activación de AKT en muestras de pacientes con carcinoma de mama.

Las muestras de carcinoma ductal infiltrante de mama de pacientes procedentes del Hospital Universitario La Paz, así como de tejido normal de los mismos pacientes se procesaron como se indica en Materiales y Métodos. Los niveles de proteína GRK2 y de fosforilación de AKT se determinaron con anticuerpos específicos y los datos densitométricos obtenidos se normalizaron con los niveles de actina y AKT total, respectivamente.

**A y B)** Se representan las medias de cada individuo procedentes de 4-5 determinaciones tomando como referencia los valores de una muestra control aleatoria. Se indica en cada población (control y tumoral) el valor promedio (—).



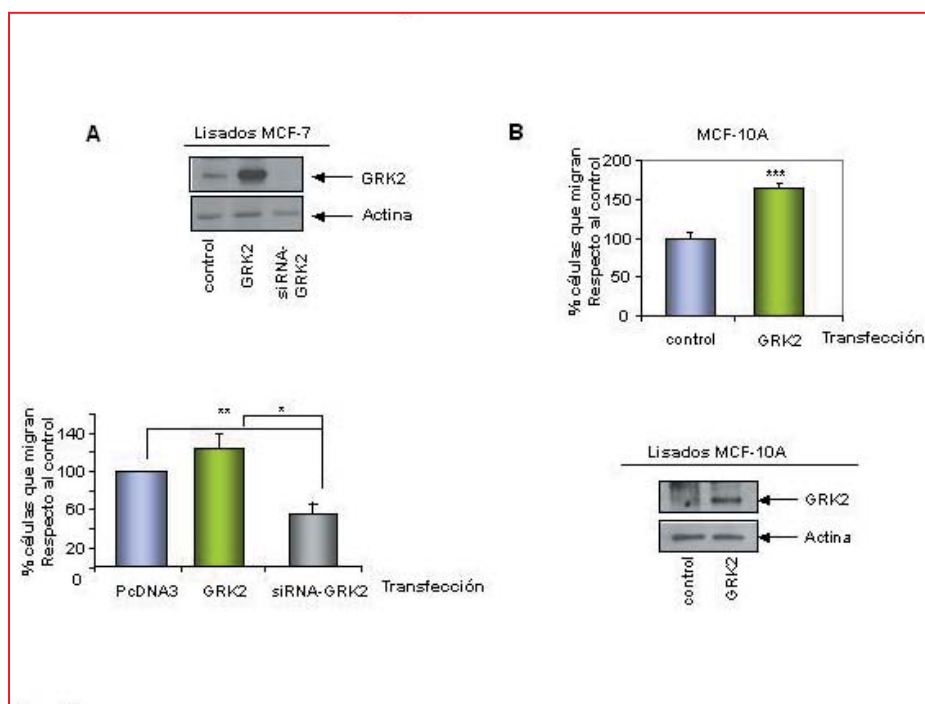


Figura 28: Los niveles de GRK2 afectan a la capacidad de migración de células MCF-7 y MCF10A en respuesta a fibronectina.

Se realizaron experimentos de migración quimiotáctica en respuesta a fibronectina en células MCF7 (**panel A**) y MCF10A (**panel B**) transfectadas con el vector de expresión de GRK2, el vector de expresión de la construcción siRNA de GRK2 o el vector vacío en combinación con el vector de CD-8 y seleccionadas por el método dynabeads, tal y como se indica en Materiales y Métodos. Se representan las medias  $\pm$ SEM de 3-4 experimentos realizados por duplicado.

sión de GRK2, bien aumentando sus niveles transitoriamente por transfección, bien disminuyéndolos con construcciones siRNA o por infección con adenovirus de siRNA GRK2, tanto en células transformadas HS578T, MCF-7 y BL16F10, como en células no transformadas MCF-10A.

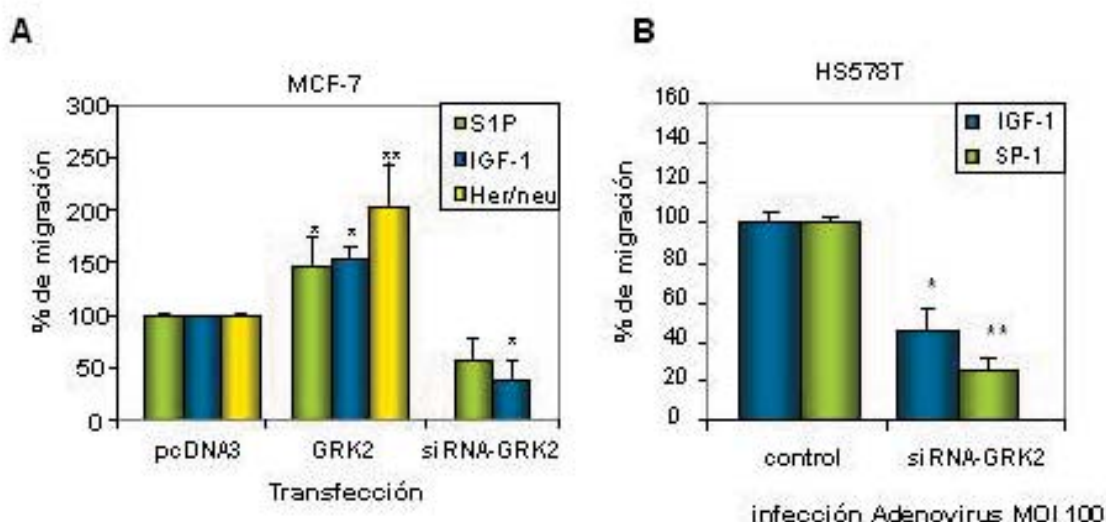
#### 4.1.- GRK2 participa en la migración celular de MCF-7 en respuesta a fibronectina.

La migración celular es un proceso complejo que requiere coordinar cambios en el citoesqueleto de la célula (necesarios para generar las fuerzas de tracción precisas para la locomoción), con los estímulos extracelulares pro-migratorios, transmitidos al interior celular por distintos receptores de membrana, entre los que destacan GPCRs y receptores con actividad quinasa. Las interacciones de receptores de integrinas y sus ligandos de la matriz extracelular no sólo son importantes en la adhesión de las células al sustrato, determinando la movilidad de las mismas, sino también en proporcionar rutas de migración actuando como guías (revisado en Guo, 2004). Este papel es crítico en el proceso de invasión de las células tumorales, que deben degradar la lámina basal y la matriz extracelular del tejido de origen y reconocer determinados componentes de la matriz extracelular como soporte físico para la locomoción. En este contexto, la fibronectina desempeña un papel importante en la progresión tumoral. Esta glicoproteína puede presentarse como molécula soluble o fibronectina plasmática, resultado de la acción de la proteasa plasmina,

o como componente de la matriz extracelular en su forma no proteolizada. Una característica común a numerosos tumores es el aumento de la actividad del sistema UPAR/ plasmina y la mayor presencia de fibronectina plasmática (Kaspar, 2005). Asimismo, numerosas células transformadas con potencial invasivo expresan receptores específicos para este tipo de fibronectina (Gaggioli, 2007). Por tanto, caracterizamos el papel de GRK2 en la respuesta migratoria a fibronectina de las células de epitelio de mama transformadas MCF-7.

Las células se transfectaron de manera transitoria con un plásmido de expresión de GRK2 o con una construcción de siRNA específica, y se seleccionaron con el método "dynabeads" (ver Materiales y Métodos) para enriquecer la proporción de células transfectadas. El aumento de expresión de GRK2 en células MCF-7 causa una mayor migración a fibronectina (fig 28A). Por el contrario, la inhibición de la expresión de la quinasa provoca una fuerte disminución de la migración en comparación con las células control que han sido transfectadas con un plásmido vacío (pcDNA3) (fig 28A).

Estos resultados sugerían una correlación positiva entre los niveles de GRK2 y la motilidad celular. Con el fin de generalizar esta correlación, analizamos si la presencia de GRK2 regulaba la migración en células normalmente con escasa motilidad como la línea celular no transformada MCF-10A, que posee además bajos niveles de expresión de GRK2. Como se observa en la figura 28 B, la sobreexpresión de la quinasa estimula el fenotipo migratorio de estas células a señales de fibronectina. En este caso, el número de células



**Figura 29:** Modulación por GRK2 de la migración inducida por distintas señales quimiotácticas difusibles.

Las células MCF7 (**panel A**) transitoriamente transfectadas con un vector vacío, el vector de expresión de GRK2 o la construcción de siRNA-GRK2, se seleccionaron como anteriormente para ensayos de migración quimiotáctica a las señales indicadas. Similares ensayos se llevaron a cabo en las células Hs578T (**panel B**) infectadas o no con el adenovirus control y la construcción de siRNA-GRK2 a MOI 100. Se representan las medias  $\pm$ SEM de 3-4 experimentos realizados por duplicado, donde \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$ , cuando se comparan con los controles de transfección del vector vacío o con las células infectadas con el Adcontrol (Hs578T), no difiriendo la motilidad de éstas últimas respecto a las células sin infectar.

las MCF-10A que migran al aumentar los niveles de GRK2 es similar al número de células en migración registradas para MCF-7 (MCF-7=44; MCF-10A + GRK2=47,4, promedio de células que migran por campo en ambos casos). Por tanto, estos resultados sugieren que potenciales señales oncogénicas que converjan en la activación de AKT, aumentarían los niveles de GRK2 en células epiteliales normales y este aumento facilitaría la migración celular en un contexto tumoral.

#### 4.2.- La respuesta migratoria de células epiteliales de mama transformadas se ve afectada por variaciones en los niveles de GRK2 en respuesta a distintas señales que estimulan la actividad de AKT.

La migración aberrante de las células cancerosas responde a gradientes quimiotácticos diversos que estimulan la evasión de las mismas del foco tumoral primario. Algunas de estas señales quimiotácticas, como S1P e IGF-1, proceden con frecuencia del estroma "reactivo" al tumor, producidas por fibroblastos y células del sistema inmune (Milstien, 2006). Tanto S1P como IGF-1 son los factores que regulan no sólo la migración de las células epiteliales de mama,

sino también su proliferación y supervivencia. Estas señales confluyen en la activación de AKT, lo cual desencadenaría la acumulación de GRK2 y la potenciación de la migración celular. Por tanto, quisimos determinar si la migración mediada por este tipo de estímulos estaba modulada por los niveles de expresión de GRK2.

En la figura 29 A se muestra que el aumento en los niveles de GRK2 en células MCF-7 transitoriamente transfectadas induce una mayor migración frente a los estímulos de S1P e IGF-1. De nuevo, y de forma similar a lo observado en la migración dependiente de fibronectina, la presencia de un RNA de interferencia específico de GRK2 atenúa la respuesta migratoria de MCF-7 a estas señales solubles, reduciéndose un 50% en comparación con las células control.

Asimismo, la regulación dependiente de GRK2 de la migración a señales quimiotácticas también se extiende a otros tipos celulares transformados de epitelio de mama con un grado de diferenciación distinto al de MCF-7, tal y como observamos en la línea celular Hs578T, derivada de un carcinoma ductal infiltrante poco diferenciado. Tras la infección de estas células con el vector adenoviral siRNA de GRK2, la migración en respuesta a IGF-1 y a S1P se inhibe fuertemente, alcanzando un 55,5% de inhibición de la respuesta migratoria normal a IGF-1 y un 74% con S1P, mientras que las células con el



A

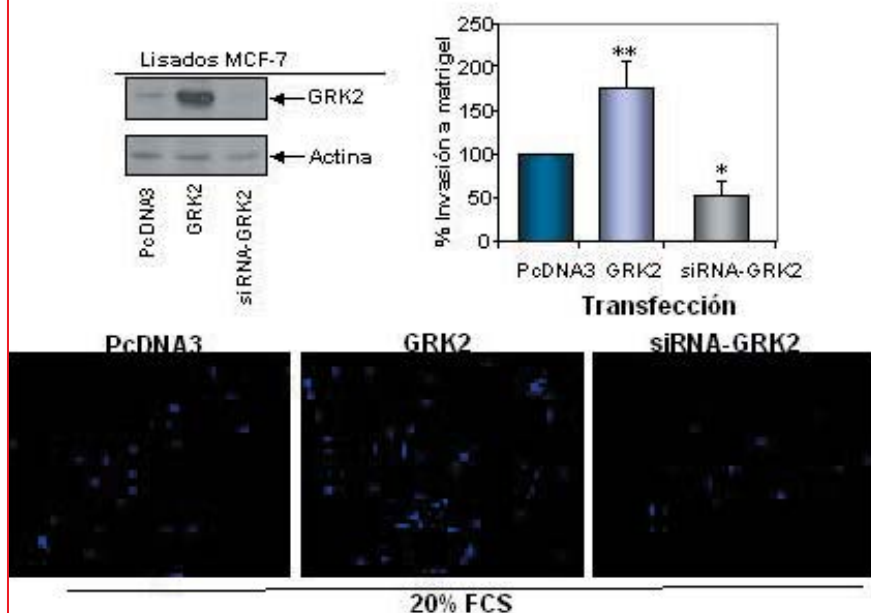


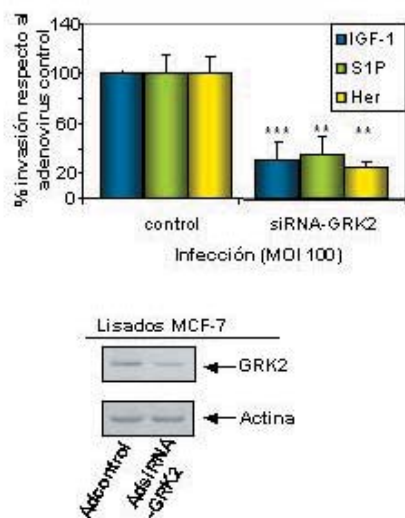
Figura 30: La capacidad de invadir matrigel en células MCF7 está modulada por los niveles de GRK2.

A) Las células transfectadas en las mismas condiciones mencionadas anteriormente se utilizaron para realizar experimentos de invasión en matrigel en respuesta a 20% suero, tal y como se detalla en Materiales y Métodos. Se muestran campos representativos de las células que invaden teñidas con Dapi, tal y como se detalla en Materiales y Métodos.

adenovirus control no muestran alteraciones en la motilidad comparado con las células sin tratar (fig 29B).

En base a estos resultados podemos concluir que los niveles de GRK2 son críticos en la migración de las células de epitelio de mama en respuesta a determinados estímulos implicados en la progresión tumoral.

B



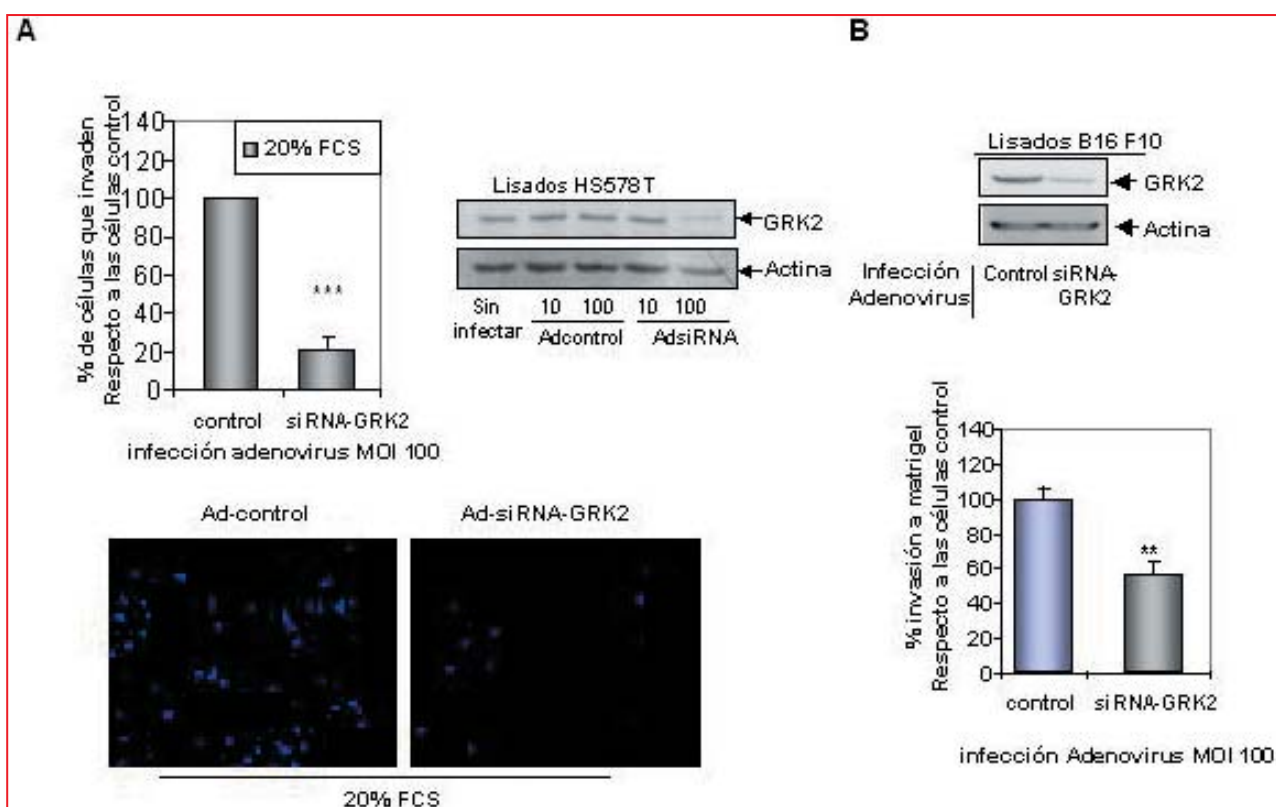
B) Las células MCF7 sin infectar e infectadas con el adenovirus control o con la construcción siRNA-GRK2 a MOI 100 se emplearon para realizar experimentos de invasión en matrigel en respuesta a los estímulos indicados.

Se representan las medias  $\pm$ SEM de 3-4 experimentos realizados por duplicado donde \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ , comparando con los controles de transfección de vector vacío o con los de células infectadas con el adenovirus control. Se muestran autorradiografías representativas de los cambios incluidos en los niveles de GRK2.

En este contexto, los ligandos de la familia de los receptores ErbB son especialmente relevantes en el desarrollo de tumores de mama. El proto-oncogen ErbB2 se halla sobreexpresado en cerca del 30% de este tipo de tumores. Dado que la estimulación de estos receptores es una potente señal para la inducción de la motilidad y supervivencia celulares, constituyendo su presencia un marcador pronóstico de la malignidad del tumor y de su capacidad metastática (McKeage, 2002; Press, 1993; Slamon, 1987), analizamos si la expresión de GRK2 modulaba la respuesta quimiotáctica inducida por estos receptores. Ya que no se ha identificado un ligando específico para ErbB2, las células MCF-7 se estimularon con heregulina, que promueve la heterodimerización de los receptores ErbB2 con los receptores ErbB3 y ErbB4, y su activación (Carpenter, 2003). Como se aprecia en la figura 29 A, la sobreexpresión de GRK2 aumenta notablemente la migración de células MCF-7 a heregulina. Estos resultados refuerzan la implicación funcional de esta quinasa en el desarrollo y/ o adquisición de las características tumorales de las células transformadas.

#### 4.3.- GRK2 potencia la capacidad invasiva de diversas células tumorales de mama con distintos grados de transformación.

Como ya hemos mencionado, una de las características claves de la progresión tumoral



**Figura 31:** Los niveles de GRK2 afectan a la capacidad invasiva de líneas celulares procedentes de tumores metastáticos.

Las células de carcinoma de mama Hs578T (**panel A**) y el melanoma B16F10 (**panel B**) sin infectar e infectadas con el adenovirus control o con la construcción siRNA-GRK2 a MOI 100 se utilizaron para ensayos de invasión en matrigel en respuesta a suero, tal y como se indica en Materiales y Métodos. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . La reducción de los niveles de GRK2 se confirmó mediante inmunodetección. Se muestran campos representativos de las células que invaden teñidas con Dapi, tal y como se detalla en Materiales y Métodos.

es la habilidad de metastatizar o invadir otros tejidos para lo cual las células transformadas adquieren la capacidad de degradar la lámina basal y la matriz extracelular a través de la cual migran en respuesta a gradientes quimiotácticos. Dado que GRK2 modulaba la migración a estos gradientes, nos planteamos determinar si la presencia de GRK2 tenía también algún efecto en la capacidad de invasión de las células de epitelio de mama estimuladas por señales quimiotácticas relevantes en los tumores de mama. Así, los niveles de GRK2 se modificaron en la línea celular poco invasiva MCF-7, transfecando como ya se ha descrito con el vector de expresión de la quinasa o con la construcción siRNA-GRK2, y se analizó la respuesta invasiva de estas células a estímulos presentes en el suero mediante ensayos de invasión a matrigel (fig 30A). Estos ensayos simulan en cierta medida las condiciones de invasión “in vivo”, ya que el matrigel, matriz extracelular obtenida a partir de tumores aislados de ratón y compuesta por laminina, colágenoIV y factores de crecimiento entre otros (Albini. A, 2004), mimetiza la lámina basal de los tejidos.

observa una clara correlación entre los niveles de expresión de GRK2 y la invasividad celular. Así, la sobreexpresión de la quinasa promueve un 75% más de invasión respecto a las células control, mientras que la disminución de GRK2 reduce un 50% la capacidad de invasión de células MCF-7 en respuesta a suero (fig 30A). De modo similar, la invasión del matrigel en respuesta a IGF-1, S1P y heregulina también se inhibe apreciablemente (más del 60%) al bloquear la expresión de GRK2 en células MCF-7 (fig. 30B).

La siguiente cuestión fue determinar si los efectos de GRK2 en la capacidad de invasión eran extensibles también a líneas celulares con un fenotipo acusadamente invasivo. Para ello, utilizamos las células de mama HS578T y células de melanoma B16F10, capaces de inducir tumores en ratones “nude” y metastatizar, así como de penetrar matrices de colágeno con alta eficiencia en respuesta a suero (Lacroix, 2004). Como se observa en la figura 31, la disminución de los niveles de GRK2, mediante infección con el vector adenoviral siRNA-GRK2, promueve una muy notable reducción en la capacidad de invasión a matrigel de células Hs578T y B16F10.

En estas condiciones experimentales se

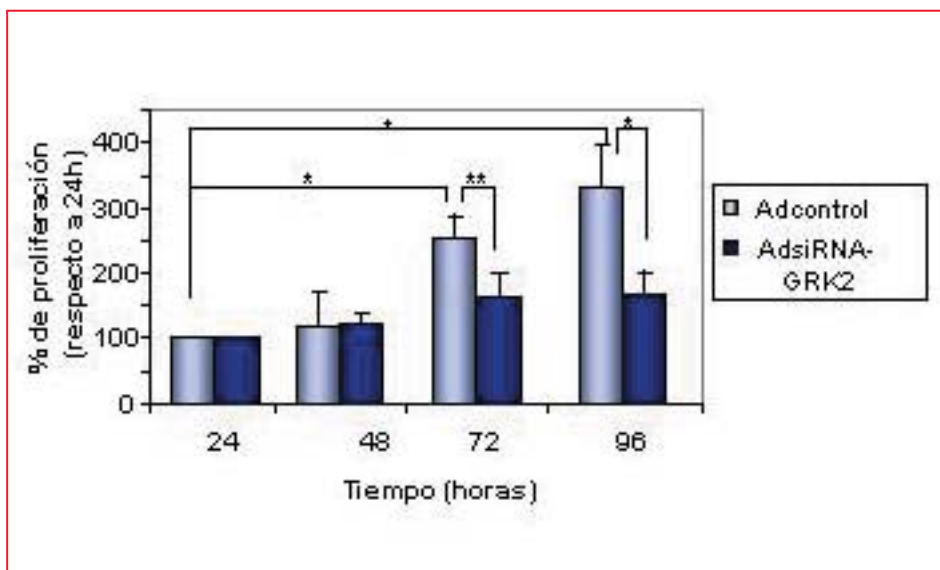


Figura 32: Efecto de los niveles de GRK2 en la proliferación celular.

Las células MCF-7 se infectaron tal y como se ha indicado anteriormente con el vector adenoviral de la construcción siRNA de GRK2 o con el adenovirus control. La proliferación celular se determinó por el método CellTiter 96® AQueous (Promega) en placas multipocillo-96 a los tiempos indicados. Se muestran las medias  $\pm$ SEM de 4 experimentos realizados por cuadruplicado. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$ .

Este conjunto de resultados pone de manifiesto por primera vez que GRK2 es una molécula clave en la modulación de la migración y la invasión tumoral a diferentes estímulos que señalizan a través de receptores de membrana de naturaleza muy diversa. Esto sugiere, además, que GRK2 debe desempeñar un papel funcional básico y general en el proceso de migración e invasión. En línea con este concepto, la regulación de la invasividad por GRK2 se observa no sólo en líneas tumorales de muy diferente origen, como carcinomas de mama y melanomas, sino también en células no transformadas. Por tanto, GRK2 debe modular actividades fundamentales en migración, relacionadas quizás con cambios del citoesqueleto, la adhesión y/o la integración de señales migratorias difusibles en estos procesos.

En este contexto, la regulación de los niveles de expresión de GRK2 por AKT representaría un mecanismo clave por el cual las células adquirirían un mayor potencial migratorio y tendrían facilitado el proceso de transformación tumoral. Así, células con altos niveles de GRK2 podrían presentar y adquirir un fenotipo transformado. En efecto, el análisis de los niveles endógenos de GRK2 en varias líneas celulares muestra que células no transformadas y con reducida motilidad como MCF-10A y 184B5 expresan menores niveles de GRK2 que células transformadas y móviles como MCF-7 o MDA-MB-468 (fig 26).

su participación en procesos de supervivencia celular, promoviendo mecanismos de escapada de apoptosis y la proliferación celular. Dado que GRK2 está sujeto a la regulación al alza mediada por AKT, nos preguntamos si GRK2 podía estar modulando, además de la migración/ invasión de células del epitelio de mama, procesos como la proliferación celular. Para ello, analizamos la tasa de crecimiento en respuesta a suero de células MCF-7 tratadas con un adenovirus control o con la construcción viral del siRNA de GRK2 tras 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo. La figura 32 muestra que la disminución de los niveles de GRK2 afecta a la capacidad proliferativa de las células a partir de las 72 horas. En el intervalo de tiempo de 72 a 96 horas, las células que han sido infectadas con el adenovirus de siRNA-GRK2 muestran un menor crecimiento ( $163,5 \pm 36\%$  y  $167 \pm 33\%$  de proliferación a las 72 y 96 horas, respectivamente, comparado con 24h) que las células control ( $253 \pm 34\%$  de proliferación a las 72 horas y  $331 \pm 60\%$  a las 96 horas) (Fig 32).

#### 4.4.-Los niveles de GRK2 afectan a la tasa de proliferación celular.

Otra de las funciones de AKT en diversos tipos de tumores anteriormente mencionada es

## 5.- MDM2 COMO SUSTRATO DE FOSFORILACIÓN DE GRK2.

### 5.1.- GRK2 fosforila a Mdm2.

GRK2 puede modular numerosas vías de señalización implicadas en la migración celular y la proliferación mediante la desensibilización de receptores acoplados a proteínas G, así como de receptores tirosina quinasa, y la regulación de otras proteínas señalizadoras. En este sentido, se han caracterizado recientemente diversos sustratos de GRK2 como fosducinas, Dream/calsenilina (Ruiz-Gómez, 2000), ezrina (Cant, 2005) y p38 (Peregrín, 2006), que no son proteínas receptores, y que expanden las capacidades funcionales de esta quinasa. Con el fin de identificar nuevos sustratos de GRK2 que pudieran relacionarse funcionalmente con la acumulación de la proteína en contextos de señalización pro-oncogénica, analizamos posibles candidatos en el interactoma de GRK2. Curiosamente, la ligasa Mdm2 ha sido implicada recientemente en conferir invasividad cuando se sobreexpresa en células de epitelio de mama (Yang, 2006) así como en la regulación del ciclo celular y la proliferación (Argentini, 2000; Levav-Cohen, 2005). Dada la interacción directa de

Mdm2 y GRK2 y el papel positivo de ambas en la modulación de la migración/ invasión y la proliferación celular, nos planteamos determinar si Mdm2 podría ser un nuevo sustrato de GRK2.

Para ello se realizaron ensayos de fosforilación "in vitro" con GRK2 recombinante y GST-Mdm2 purificada. Como se muestra en la figura 33, la proteína GST-Mdm2 se fosforila por GRK2 de modo específico, ya que la adición de heparina, inhibidor de la actividad catalítica de GRK2, disminuye drásticamente la autofosforilación de la quinasa y la fosforilación de GST-

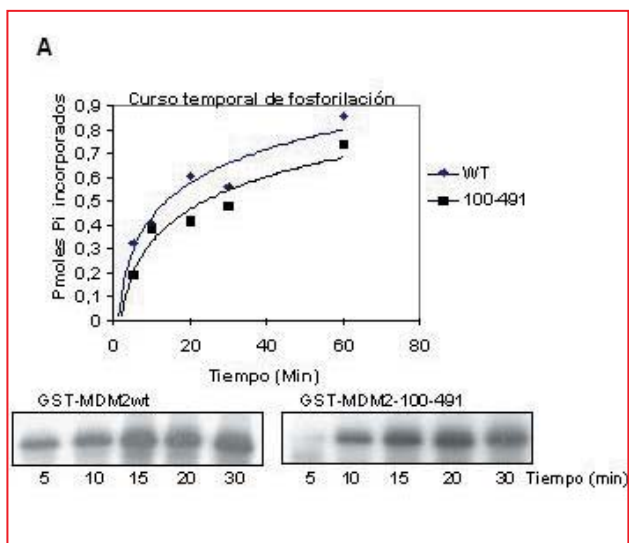


Figura 34: Estudio del curso temporal y cinética de la fosforilación de Mdm2 catalizada por GRK2.

A) Representación gráfica del curso temporal de la fosforilación de GST-Mdm2 salvaje (wt) y GST-Mdm2 100-491 por GRK2 recombinante.

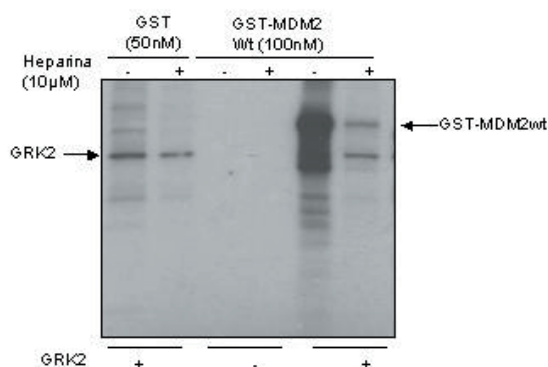
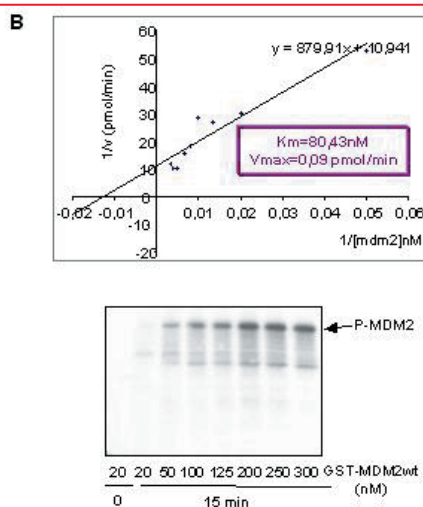


Figura 33: GRK2 fosforila a Mdm2 "in vitro".

La proteína GRK2 recombinante y las proteínas GST y GST-Mdm2 purificadas se incubaron en condiciones de fosforilación con  $^{32}$ P-ATP durante 30 minutos en presencia y ausencia de heparina, tal y como se indica en Materiales y Métodos. Las proteínas se resolvieron en geles de acrilamida SDS-PAGE. Se muestra una autorradiografía representativa.



B) Representación de Michaelis-Menten en el que el eje de las X muestra el inverso de la concentración del sustrato y el eje de las Y el inverso de la velocidad de la reacción. (Ver Materiales y Métodos).

Mdm2. La fosforilación de Mdm2 no es un artefacto de la preparación de la proteína de fusión ya que depende únicamente de la presencia de GRK2. Además, GRK2 no fosforila a la proteína GST sola, indicando que el sitio o sitios de fosforilación residen en Mdm2. Dichos residuos parecen estar localizados entre los aminoácidos 100-491, ya que la eliminación de los 100 primeros residuos que comprenden el sitio de unión a p53, no impide la fosforilación (ver figura 34).

La caracterización cinética de la fosforilación de Mdm2 por GRK2 demuestra que este proceso es rápido y saturable a partir de los 10-15 minutos, tanto para la proteína Mdm2 salvaje como para la forma truncada. GRK2 fosforila a

Mdm2 con alta afinidad, ( $K_m = 80,43 \text{ nM}$ ) máxime teniendo en cuenta que el sustrato es una proteína de fusión, y con una  $V_{max} = 0,09 \text{ pmol/min}$  (fig 34), tal y como se infiere de la representación de los inversos de la velocidad de la reacción frente al inverso de la concentración de sustrato. Estos resultados sugieren que la interacción de GRK2 y Mdm2 puede tener simultáneamente consecuencias para la estabilidad de la quinasa y para la funcionalidad de la ligasa, con posibles repercusiones en procesos celulares de la migración o la proliferación. La fosforilación de Mdm2 por GRK2 abre nuevas posibilidades de regulación de esta oncoproteína que serán objeto de estudio en el futuro.



DISCUSIÓN



transitoria incrementa la ubiquitilación “in situ” de GRK2 tanto en condiciones basales como de estimulación, y rescata la degradación defectiva del mutante inactivo GRK2-K220R hasta alcan-

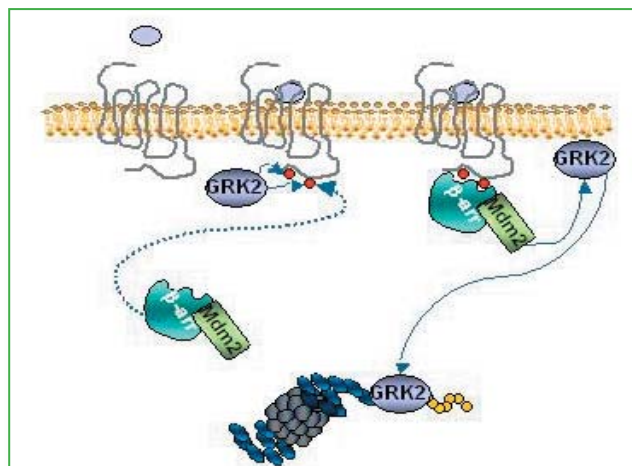


Figura D-1: Modelo de implicación de Mdm2 en la degradación de GRK2 por la vía del proteasoma.

### 1.- Mdm2 desempeña un papel clave en la degradación de GRK2.

La oncoproteína Mdm2 es una E3-ubiquitina ligasa bien caracterizada por su función reguladora de la estabilidad y de la actividad transcripcional de p53 (Bond, 2005; Yang, 2004). Las funciones celulares de Mdm2 se han ido ampliando conforme a la identificación de nuevas proteínas de interacción, las cuales son críticas bien en la regulación de la ligasa, bien en el papel efector de la misma actuando como sustratos susceptibles de ubiquitilación (Iwakuma, 2003; Jin, 2003; Lin, 2002; Pan, 2003; Uchida, 2005). En esta memoria hemos identificado a GRK2 como un nuevo sustrato de la ligasa Mdm2.

Los resultados presentados demuestran la importancia de Mdm2 en los procesos de ubiquitilación y degradación de GRK2 (ver modelo en fig D-1). En primer lugar, ambas proteínas endógenas pueden encontrarse en el mismo complejo macromolecular en condiciones basales, tal y como se ha demostrado mediante experimentos de co-inmunoprecipitación. Además, el hecho de que la estimulación del receptor β2-adrenérgico aumente la asociación transitoria de GRK2 y Mdm2 endógenas, sugiere que es un proceso específico y modulable. En segundo lugar, la sobreexpresión de Mdm2 mediante transfección

zar valores similares a los de la quinasa salvaje. Por último, Mdm2 parece ser clave en la degradación de GRK2 inducida por agonista, ya que la ubiquitilación y degradación de la quinasa se ven impedidas en células MEFs que carecen de Mdm2 comparadas con las células MEFs salvajes, mientras que estas deficiencias en el reciclaje de GRK2 se pueden revertir con la reintroducción de Mdm2 exógena .

Anteriormente se había demostrado la ubiquitilación dependiente de Mdm2 de diferentes moléculas en respuesta a la estimulación de receptores de membrana (Girnit, 2005; Shenoy, 2001), así como el requerimiento de β-arrestina para el reclutamiento de la ligasa en el contexto molecular del receptor activado. Tanto β-arrestina-1 como β-arrestina-2 son capaces de unir Mdm2 y por lo tanto de situar la ligasa en las inmediaciones del receptor tras su estimulación (Wang, 2003). En esta memoria hemos presentado datos que demuestran que β-arrestina-1 participa activamente en la degradación de GRK2, facilitando la asociación GRK2/ Mdm2 promovida por la estimulación con el agonista isoproterenol. Además, la ausencia de β-arrestinas 1 y 2 en células MEFs modificadas genéticamente disminuye drásticamente el patrón de ubiquitilación de GRK2, confirmando la necesidad de un adecuado reclutamiento de Mdm2 al complejo del receptor activado, donde sucedería la ubiquitilación de sustratos de manera dependiente de β-arrestina.

Song y colaboradores (2006) determinaron que todas las arrestinas son capaces de unir Mdm2 y que la afinidad de estas interacciones

vendría determinada por la conformación de las mismas. Así, Mdm2 une preferentemente  $\beta$ -arrestinas en su conformación basal y libre de la asociación con receptores, mientras que la unión de  $\beta$ -arrestina al receptor activado debilita la interacción entre Mdm2 y  $\beta$ -arrestina, lo cual permite que la ligasa quede disponible para modificar diversos sustratos (Song, 2006). De acuerdo con este escenario, nuestros datos indican que la función adaptadora de  $\beta$ -arrestina en la ubiquitilación y degradación de GRK2 dependiente de Mdm2 sólo es posible si la asociación de Mdm2 a  $\beta$ -arrestina está dinámicamente regulada y compartimentalizada. En efecto, una excesiva afección de  $\beta$ -arrestina por Mdm2, tal y como se observa con el mutante  $\beta$ -arrestina-1 V53D, impide la correcta ubiquitilación y degradación de GRK2 por la ligasa.

La distribución citosólica de Mdm2 está regulada por diversas modificaciones post-traduccionales y por la interacción con múltiples proteínas. Así,  $\beta$ -arrestina-2 promueve la distribución citosólica de Mdm2 (Wang, 2003), mientras que  $\beta$ -arrestina-1 cooperaría junto con  $\beta$ -arrestina-2 en el mantenimiento de una subpoblación citosólica de Mdm2 accesible para diversos sustratos de la ligasa (como GRK2) en respuesta a distintos estímulos. Hemos demostrado que alteraciones en la distribución subcelular de Mdm2 tienen consecuencias directas en la estabilidad de GRK2. Así, el tratamiento con LMB, que bloquea el tráfico núcleo- citoplasmático y promueve la retención nuclear de Mdm2 y  $\beta$ -arrestina-2 (Scott, 2002; Wang, 2003), disminuye la degradación de la quinasa y aumenta los niveles endógenos de la proteína.

Se ha descrito que Mdm2 mono-ubiquitila a p53 en múltiples lisinas, mientras que su poli-ubiquitilación requiere la asociación de la ligasa con el cofactor transcripcional P300, que actúa en este contexto como un factor E4 favoreciendo la procesividad de la ubiquitilación (Lai, 2001; Grossman, 2003). Aunque sería necesario analizar con más detalle el mapa de ubiquitilación de GRK2, nuestros datos indican que las lisinas 19, 21, 30 y 31 son residuos críticos tanto para la mono- como para la poli-ubiquitilación de GRK2 promovidas por Mdm2. Sin embargo, no podemos descartar que la mono-ubiquitilación de varias lisinas dependiente de Mdm2 actúe como cebador para la poli-ubiquitilación por una ligasa secundaria.

## 2.- Existen otras vías independientes de Mdm2 que modulan la degradación de GRK2.

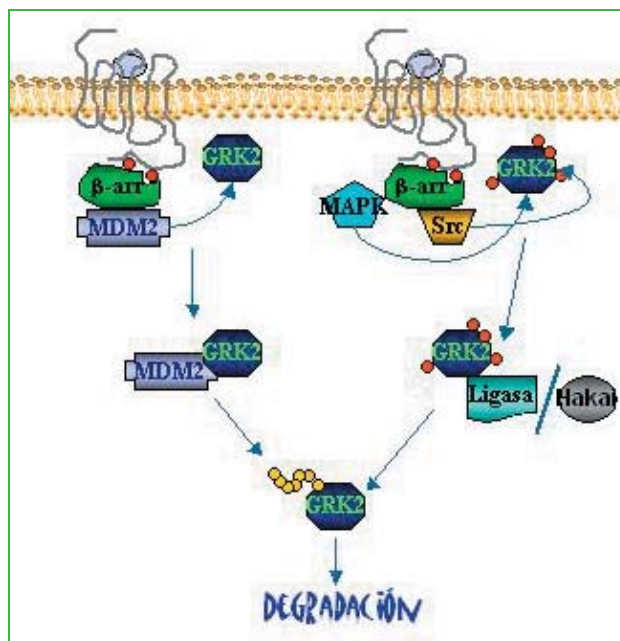


Figura D-2: Distintos mecanismos de participación de  $\beta$ -arrestinas en la degradación de GRK2 estimulada por GPCRs.

A pesar de que Mdm2 desempeña una función clave en la regulación de la estabilidad de GRK2, existen otras actividades E3 ligasas que podrían modular los niveles de GRK2.  $\beta$ -arrestina es capaz de reclutar otras E3 ligasas además de Mdm2 a las inmediaciones del receptor (Shenoy, 2001). En este sentido, hemos descrito con anterioridad que  $\beta$ -arrestina es necesaria para promover la fosforilación de GRK2 en residuos de tirosina por c-Src y de serina por MAPK en respuesta a la estimulación de receptores de membrana GPCRs (Penela, 2001; Elorza, 2000; Penela, 1999). En esta memoria mostramos que estas modificaciones en GRK2 tienen como consecuencia la degradación de la quinasa por una vía independiente de Mdm2. Así, hemos demostrado que la función adaptadora de  $\beta$ -arrestina en la degradación de GRK2 es doble, reclutando por un lado la ligasa Mdm2 y por otro, facilitando la fosforilación de GRK2 y su reconocimiento por una segunda familia de ligasas (ver modelo en fig D-2). En este sentido, hemos identificado a Hakai, una E3 ligasa que ubiquitila sustratos modificados por fosforilación en tirosinas (Fujita, 2002), como molécula candidata a participar en la degradación de GRK2 dependiente de fosforilación tras la estimulación de GPCRs, ya que esta ligasa no promueve la degradación de un mutante de GRK2 que carece de las tirosinas fosforiladas por c-Src, mientras que si lo hace eficientemente en la quinasa salvaje.

Según nuestro modelo, Mdm2 se encargaría de modular la estabilidad de GRK2 independientemente de su estado de fosforilación,

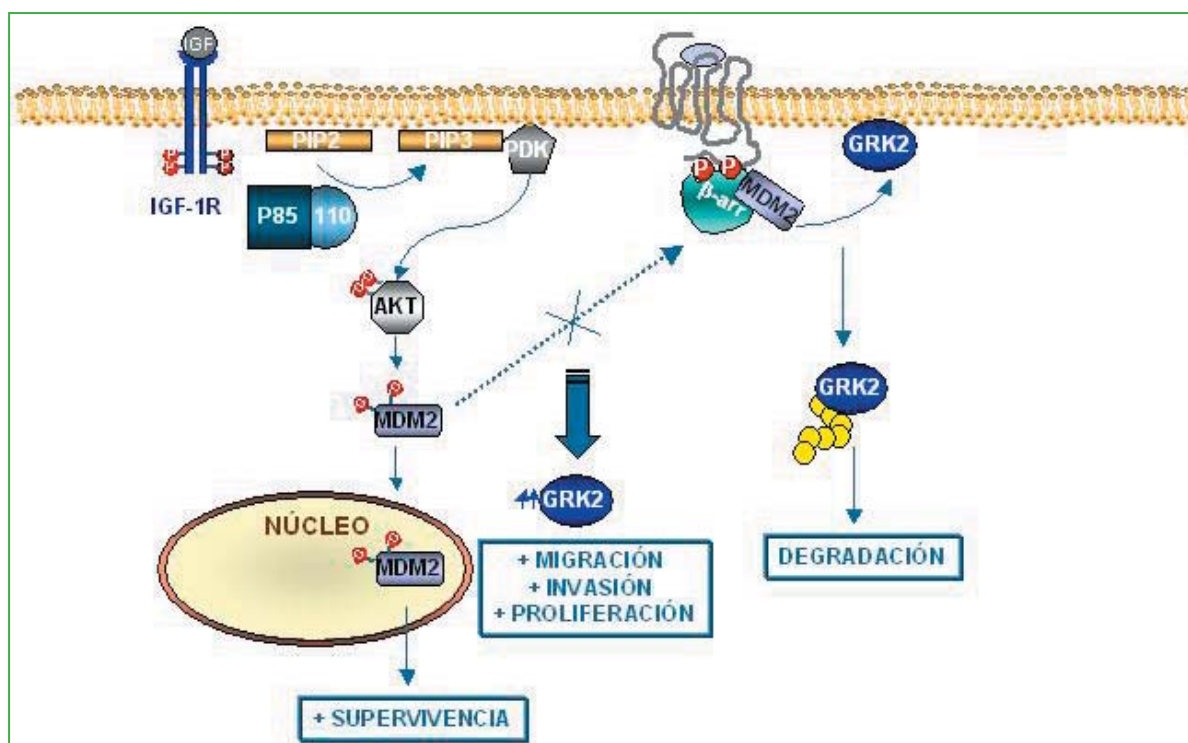


Figura D-3: La estimulación de la vía PI3K/ AKT impide la degradación de GRK2 por Mdm2 y aumenta sus niveles de expresión.

mientras que Hakai actuaría solamente en respuesta a determinados estímulos que promuevan la fosforilación de la quinasa en tirosinas. En este contexto, sería interesante determinar en qué medida Hakai participa en el reciclaje residual de GRK2 cuando Mdm2 no esté disponible (bien como resultado de la activación de la vía PI3K/ AKT u otras situaciones que favorezcan la localización nuclear de Mdm2). Asimismo, será necesario determinar si  $\beta$ -arrestinas participan en el reclutamiento directo de Hakai, y de ser así, como se coordinan y organizan temporalmente las interacciones de  $\beta$ -arrestinas con las ligasas Hakai y Mdm2 y la ubiquitilación de GRK2 por ambas ligasas. No cabe descartar que la modificación de GRK2 por Hakai requiera la previa mono-ubiquitilación de GRK2 dependiente de Mdm2.

### 3.- Modulación de la degradación de GRK2 por la vía PI3K/ AKT/ Mdm2.

Como ya hemos indicado, la regulación de GRK2 mediada por Mdm2 podría estar modulada por factores que afecten la localización subcelular o la actividad de la ligasa. En este sentido, la fosforilación de Mdm2 por AKT en las serinas 166 y 186 promueve la translocación nuclear de la ligasa y la ubiquitilación de p53 (Ashcroft, 2002;

Feng, 2004; Mayo, 2001; Milne, 2004). Este escenario favorecería la degradación de p53 en detrimento de sustratos citosólicos o "extranucleares". Así, la estimulación de IGF-1R, con la consecuente activación de la vía de PI3K/ AKT y la fosforilación de Mdm2, aumenta los niveles de la proteína GRK2 (ver modelo en fig D-3). Esta acumulación de GRK2 se debe a cambios en su degradación y no en su síntesis, ya que el uso de cicloheximida no consigue revertir este efecto. Este nuevo mecanismo de regulación de los niveles de GRK2 es dependiente de la actividad de AKT y de la fosforilación de Mdm2 puesto que tanto el inhibidor de PI3K LY290042, el inhibidor de la quinasa AKT (ML9), como un mutante de la ligasa incapaz de fosforilarse por AKT (Mdm2-S166A-S186A), impiden aumentar los niveles de GRK2 en respuesta a IGF-1. Más aún, el efecto de IGF-1 sobre la expresión de GRK2 no se observa en MEFs deficientes para Mdm2. La asociación diferencial que presentan los mutantes de fosforilación de Mdm2 por AKT (Mdm2 S166A-S186A y Mdm2 S166D-186D) con GRK2 podría deberse tanto a las distintas localizaciones subcelulares que presentan ambas proteínas o a cambios conformacionales en Mdm2 que afecten a la interacción con GRK2.

Frecuentemente se han relacionado alteraciones en la expresión de GRK2 con situaciones fisiopatológicas, tal y como se ha descrito en artritis reumatoide y en esclerosis múltiple, donde los niveles de expresión de la quinasa son



bajos, mientras que en hipertensión y fallo cardíaco los niveles de GRK2 están regulados al alza. Curiosamente, la expresión de Mdm2 está aumentada en pacientes que sufren artritis reumatoide (Taranto, 2005), pudiendo contribuir al decaimiento de GRK2, el cual se ha demostrado es el resultado de una desestabilización de la proteína (Lombardi, 1999). Por otro lado, una sobre-estimulación de la vía PI3K/ AKT puede promover aumentos significativos de la proteína GRK2 en distintos contextos celulares, y estas alteraciones favorecer ciertas situaciones fisiopatológicas. Así, una proporción significativa de tumores de cáncer de mama presentan altos niveles de activación de AKT y de Mdm2 fosforilado por AKT en los residuos S166 y S186 (Zhou, 2001). Es interesante destacar que el presente trabajo muestra que los niveles de expresión de GRK2 están aumentados en una proporción significativa de pacientes con carcinomas de mama, y que dichos aumentos de expresión están correlacionados positivamente con el grado de activación de AKT.

A pesar de ello, cabe destacar que existe una proporción significativa de pacientes que muestran niveles altos de GRK2 (~41%) aunque no se detecta activación de AKT. Es posible que existan otras quinasas distintas de AKT que fosforilen también a Mdm2 en la serina 166 promoviendo su localización nuclear, como MK2 (Weber, 2005) y MEK/ ERK (Malmlof, 2007), las cuales podrían promover la estabilización de GRK2. En este sentido, existen evidencias que demuestran que en tejidos donde AKT no puede fosforilar Mdm2 en su serina 166, MEK/ ERK se encargaría de hacerlo y viceversa (Malmlof, 2007). Por tanto, sería de gran interés estudiar el estado de activación de estas quinasas en aquellas muestras AKT negativas pero GRK2 positivas.

Un primer análisis del historial clínico de los pacientes que muestran aumentos en los niveles de GRK2 revela también una cierta correlación con el grado de diferenciación del carcinoma. Así, todas las muestras que alcanzan el grado G3 (caracterizado por una pobre diferenciación celular), presentan niveles de GRK2 altos (GRK2 positivos) o sin cambios respecto al promedio de la población control (GRK2 positivos 46%, GRK2 sin cambio 56%, GRK2 negativos 0%). Asimismo, el 70% de los pacientes que han sufrido metástasis en los nódulos linfáticos axilares presenta niveles positivos de GRK2 frente a un 20% con niveles negativos y un 10% sin cambios, lo cual sugiere que los niveles de GRK2 pueden favorecer procesos de migración/ invasión. Por otro lado, la mayor expresión de GRK2 también parece asociarse a un mayor volumen de masa tumoral, cuyo tamaño en el

grupo de estudio oscila entre 12 y 35 mm. Así, hemos observado que en tumores de tamaño igual o superior a 25 mm se detecta una expresión de GRK2 incrementada (GRK2 positivos 78%, GRK2 negativos 11% y GRK2 sin cambio 11%) en comparación con los tumores de menor tamaño (ver figura 27D de Resultados). Es razonable pensar que los tumores de mayor tamaño hayan experimentado una mayor tasa de proliferación y/o una reducida muerte celular, y que los niveles de GRK2 al alza hayan contribuido en estos procesos.

En su conjunto, estos datos sugieren que la regulación al alza de GRK2 en ciertos contextos patológicos podría estar contribuyendo o cooperando con AKT (o con otros factores) en la adquisición o mantenimiento de características tumorales. En este sentido, hemos demostrado que los niveles de expresión de GRK2 modulan la capacidad migratoria e invasora de distintas líneas celulares de cáncer de mama y melanoma en respuesta a varias señales celulares frecuentes en contextos tumorales. Por otra parte, hemos determinado que GRK2 modula el crecimiento de las células de carcinoma de mama MCF-7, de tal modo que el bloqueo de la expresión de esta quinasa inhibe su capacidad de proliferación.

#### 4.- Implicación de GRK2 en procesos de migración e invasión.

Nuestros resultados indican que líneas celulares de mama no transformadas y con reducida motilidad (MCF-10A y 184B5) presentan menores niveles de proteína GRK2 que las líneas celulares transformadas y móviles (MCF-7 y Hs578T). Asimismo, la sobreexpresión de GRK2 en la línea celular no transformada MCF-10A confiere propiedades migratorias similares a las que presenta la línea celular transformada MCF-7. Igualmente, el incremento de los niveles de GRK2 en células MCF-7 promueve una mayor migración de estas células a suero, fibronectina, S1P e IGF-1 y de manera muy potente a heregulina, los cuales representan señales muy importantes en la progresión tumoral. Por el contrario, la disminución de los niveles de GRK2 en células de mama MCF-7 y Hs578 y en células de melanoma de ratón B16F10 disminuye la capacidad de migración y de invasión frente a estas señales. Esta modulación de la invasión por la inhibición de la expresión de GRK2 no es causada como consecuencia de variaciones en la tasa de proliferación celular que pudieran producirse durante las 24 horas que se preci-

san para realizar estos ensayos, ya que hemos observado que las diferencias en proliferación causadas por la falta de GRK2 empiezan a ser apreciables sólo a partir de las 48-72 horas (ver figura 32 de resultados).

Por tanto, la presencia de GRK2 podría facilitar procesos de transformación celular y mediar la inducción de fenotipos celulares migratorios e invasivos.

Datos previos relacionados con el papel de GRK2 en procesos de migración celular demuestran que la quinasa atenúa la respuesta migratoria inducida por ciertas citoquinas como MCP-1, SDF-1, RANTES o leucotrieno LTB4 en linfocitos T y monocitos debido a su función desensibilizadora de GPCRs (Vroon, 2006). Sin embargo, también se han descrito efectos pro-migratorios tras la activación de distintos GPCRs en varios tipos celulares, poniendo en evidencia el hecho de que GRK2 ejerce funciones distintas a la desensibilización de GPCRs, relacionadas con su capacidad de transducir señales importantes para este proceso (DeFea, 2007; Vroon, 2006). En este sentido, GRK2 es capaz de interactuar directamente y modular la actividad de moléculas claramente implicadas en migración celular como PI3K, MEK1, GIT, ezrina o tubulina (Ribas, 2007).

De acuerdo con los resultados presentados en esta memoria, datos previos de nuestro laboratorio (Penela y colaboradores, 2007, EMBO J., en revisión) demuestran que GRK2 regula de manera positiva y específica la migración de células epiteliales en respuesta a fibronectina (y no a colágeno IV). Curiosamente, la migración a fibronectina mediada por GRK2 depende de la activación de receptores acoplados a Gi activados por el ligando S1P, producido de manera autocrina o paracrina. La presencia de GRK2 potencia la señalización de los receptores de S1P, cuya estimulación modula la duración e intensidad de la activación de ERK1/2, lo cual es crítico para desorganizar las adhesiones focales de la célula favoreciendo motilidad frente a adherencia. Esta modulación de ERK1/2 por GRK2 depende de la asociación dinámica de GRK2 con GIT. GIT es una proteína adaptadora que organiza espaciotemporalmente la activación de PAK por Rac y la estimulación del módulo MEK/ ERK1/ 2 en respuesta a estímulos de GPCRs y receptores tirosina quinasa (Hoefen, 2006). En este contexto, la actividad quinasa de GRK2 no parece ser necesaria para promover la migración celular. Sin embargo, la actividad catalítica de GRK2 sí parece ser requerida para la formación de estructuras corticales del citoesqueleto de actina relacionadas con la motilidad celular. Así, GRK2 interactúa y fosforila a la proteína ezrina (Cant, 2005).

Esta modificación permite que ezrina adquiera una conformación activa y promueva cambios en el citoesqueleto necesarios para formar estructuras como filopodios y "ruffles", imprescindibles para "rastrear" sustancias quimioatrayentes y generar las fuerzas de tracción necesarias para el avance de la célula hacia dichos estímulos.

Por otro lado, Mdm2 parece estar implicada también en procesos de migración e invasión celular gracias a su actividad E3 ligasa frente a E-caderina (Yang, 2006). La pérdida de la diferenciación celular en el proceso de carcinogénesis conlleva, en general, la disminución de interacciones célula-célula, debido a la pérdida de expresión de E-caderina. La presencia de Mdm2 en líneas tumorales de mama promueve la disgregación celular y la movilidad e invasión celular, junto con una disminución de los niveles de E-caderina (Thiery, 2002). En coherencia con estas observaciones, los niveles de Mdm2 en pacientes con cáncer de mama se correlacionan inversamente con los niveles de expresión de E-caderina, especialmente en aquellos individuos positivos para la presencia de células tumorales en los nodos linfáticos axilares. En este contexto, puede ser de interés el hecho puesto de manifiesto en este trabajo, del que GRK2 fosforila a Mdm2 "in vitro". Mdm2 es una proteína muy regulada post-traduccionalmente por sumoilación, ubiquitilación, nedilación y fosforilación. Estas modificaciones afectan no sólo a su estabilidad y capacidad de inhibir a p53, sino también a propiedades de la ligasa independientes de p53 que tienen consecuencias en proliferación y migración celular. Cerca del 20% de los residuos de Mdm2 son treoninas o serinas diana de numerosas quinasas que modulan la interacción de Mdm2 con sustratos, la actividad, la localización subcelular o la interacción con otros factores. Mdm2 posee dos dominios de fosforilación (región N-terminal aa 1-193 y central aa 194-293) con una región ácida (aa 235-295) crítica en la ubiquitilación de p53 y la interacción de la ligasa con el factor ARF, P300 o RB. En esta región ácida se han identificado varios residuos fosforilados "in situ", pero no así la identidad de la quinasa o quinasas implicadas. La acción de estas quinasas en estos residuos favorece la degradación de p53, mientras que debilita la interacción de Mdm2 con ARF. Curiosamente, algunos de los residuos identificados son compatibles con el requerimiento de fosforilación de GRK2. Por tanto, será de interés determinar si GRK2 fosforila "in situ" a Mdm2 y si lo hace en este "cluster" ácido de la ligasa. De confirmarse, Mdm2 y GRK2 podrían formar un bucle de regulación retrógrada común a muchas otras proteínas, en el que Mdm2 controlaría los niveles de GRK2 y ésta a su vez, aspectos funcionales de Mdm2 relacionados con proliferación y migración.

En este sentido, sería de especial interés determinar si esta modificación modula la actividad ligasa de Mdm2 frente a E-caderina y si existe algún tipo de correlación entre los niveles de GRK2, E-caderina y Mdm2 en distintos tipos tumorales en los que no se haya producido un silenciamiento génico de E-caderina.

### 5.- Implicación de GRK2 en procesos de proliferación celular.

Nuestros resultados también indican que la expresión de GRK2 se correlaciona positivamente con la proliferación celular de células MCF-7. GRK2 podría atenuar o potenciar las respuestas proliferativas de las células dependiendo del contexto celular, mediante la regulación de varios receptores de membrana implicados en el control del crecimiento celular, como ciertos GPCRs entre los que destacan los receptores de Smoothed, S1P, PAR1 o endotelina 1 (ET1), así como los receptores tirosina quinasa EGFR, PDGFR y Ror1 o el receptor de TGF- $\beta$  (Ribas, 2007).

TGF- $\beta$  es un potente inhibidor de la proliferación celular mediante la inducción de señales de parada de ciclo y apoptosis en células normales de origen epitelial, endotelial y hematopoyético, por lo que actúa como un importante represor tumoral en los estadios tempranos de la tumorigénesis. Sin embargo, en estadios tardíos de la progresión tumoral ciertos aspectos de la señalización del receptor TGF- $\beta$  promueven proliferación e invasión en las células tumorales, facilitando procesos angiogénicos, suprimiendo el sistema inmune, favoreciendo la migración, y estimulando la expresión de proteasas (Derynck, 2001; Wakefield, 2002). La señalización del TGF- $\beta$  se inicia con la unión de este factor al receptor del tipo I de TGF- $\beta$ , el cual se activa y promueve la fosforilación de las proteínas R-Smads. Este evento permite la asociación de las R-smads con Smad-4 y la translocación de estos complejos al núcleo donde modulan transcripcionalmente diversos genes relacionados con la inhibición de la proliferación (Shi, 2003).

Recientemente, se ha descrito que GRK2 antagoniza las señales anti-proliferativas dependientes de TGF- $\beta$  "in situ" y "ex vivo" en células epiteliales de distinto origen. La regulación de la señalización del TGF- $\beta$  por GRK2 es compleja y parece depender tanto de su actividad quinasa como de efectos de andamiaje de la proteína. Así, GRK2 fosforila las proteínas R-Smads, blo-

queando su translocación al núcleo (Ho, 2005), mientras que la asociación GRK2 a las R-smads independientemente de la actividad catalítica bloquea la formación del heterocomplejo con Smad-4. En este contexto, una mayor presencia de GRK2 en estadios iniciales de la tumorigénesis favorecería la proliferación, neutralizando los efectos "supresores" del TGF- $\beta$ . Por otro lado, existen evidencias que señalan a Mdm2 como uno de los responsables del cambio de señalización del TGF- $\beta$  de anti-oncogénica a pro-oncogénica, ya que la sobreexpresión de la ligasa confiere resistencia a las señales apoptóticas mediadas por TGF- $\beta$ , en parte relacionadas con la inhibición de p53 (Kannemeier, 2007). Es atractivo especular que la fosforilación de Mdm2 por GRK2 tenga algún papel en este proceso.

GRK2 también podría promover la proliferación celular actuando como transductor positivo de la señalización celular mediada por Smoothed (Molnar, 2007). La presencia de GRK2 coopera sinérgicamente con la capacidad de Smoothed en la inducción de focos, una característica del crecimiento de células transformadas, mientras que la disminución de los niveles de GRK2 impide la señalización del receptor, e incluso la de sus variantes oncogénicas (Meloni, 2006).

Por otro lado, se ha descrito que la presencia de GRK2 atenúa la proliferación inducida por la activación del receptor PDGFR en ciertos tipos celulares. GRK2 promovería la desensibilización de estos receptores mediante la fosforilación de los mismos en serinas y treoninas (Wu, 2005). Sin embargo, es posible que el potencial desensibilizador de GRK2 esté limitado en determinadas situaciones patológicas o en respuesta a determinados estímulos. Así, la estimulación del receptor de TNF- $\alpha$  impide la translocación de GRK2 a la membrana plasmática y la desensibilización de receptores GPCRs acoplados a Gs (Khoa, 2006). Por tanto, la transmodulación o "crosstalk" de receptores puede determinar en gran medida el destino funcional de GRK2, desensibilizando GPCRs o modulando sustratos solubles, lo cual podría favorecer procesos de proliferación o motilidad celular (Khoa, 2006). Por otro lado, la fosforilación de receptores por GRK2 no siempre desencadena el desacoplamiento de éstos con proteínas G. En este sentido, se ha descrito que en células de melanoma, que expresan tanto GRK6 como GRK2, la fosforilación de receptores MCRI mediada por GRK6 promueve la internalización del receptor, mientras que la mediada por GRK2 no. Dado que el receptor MCRI, un GPCR acoplado a adenilil ciclase que promueve proliferación y diferenciación en melanocitos, constituye un gen de riesgo en cáncer (Sanchez-Laorden, 2007), es posible



que GRK2 pueda cooperar en la señalización de este receptor contribuyendo a la transformación de los melanocitos.

Además de modular receptores de membrana, GRK2 interacciona con múltiples proteínas clave en la regulación de la proliferación, supervivencia y apoptosis, modificando su funcionalidad tanto de manera dependiente como independiente de la actividad catalítica de GRK2. Así, la fosforilación de la MAPK p38 por GRK2 en el residuo T123 promueve la inhibición de esta quinasa. La modificación de este residuo situado en el "docking groove" de p38 impide la unión de las quinasas activadoras, así como el anclaje de ciertos sustratos de p38 (Peregrin, 2006), por lo que el silenciamiento funcional de p38 es doble. Dado que p38 es un efector clave en procesos apoptóticos y su inhibición en numerosos tumores es responsable de conferir resistencia a tratamientos quimioterápicos, la mayor presencia de GRK2 en tumores contribuiría a contrarrestar las acciones de p38 y favorecer la progresión tumoral. Por otro lado, la interacción de GRK2 con PI3K permite el reclutamiento de esta quinasa a

la membrana plasmática y facilita su activación de manera independiente de la actividad catalítica de GRK2. Así, la presencia de GRK2 podría favorecer la activación de las vías de PI3K/ AKT que promueven supervivencia y crecimiento.

Finalmente, la fosforilación de Mdm2 por GRK2 podría tener consecuencias también en la regulación de la proliferación celular. Así, está bien establecido que Mdm2 posee efectos proto-oncogénicos independientes de p53 que promueven la entrada de las células en fase S del ciclo celular (Argentini, 2000) mediante la regulación de proteínas implicadas en el control del mismo como RB, p21, E2F y en la proliferación celular como IGF-1R, o el receptor de andrógenos.

En definitiva, los efectos de GRK2 en migración/ invasión, así como en proliferación celular, podrían ser relevantes en el desarrollo tumoral, no sólo en estadios avanzados, donde las propiedades migratorias de las células son claves en la evasión del foco primario, sino también en estadios tempranos donde prima la proliferación

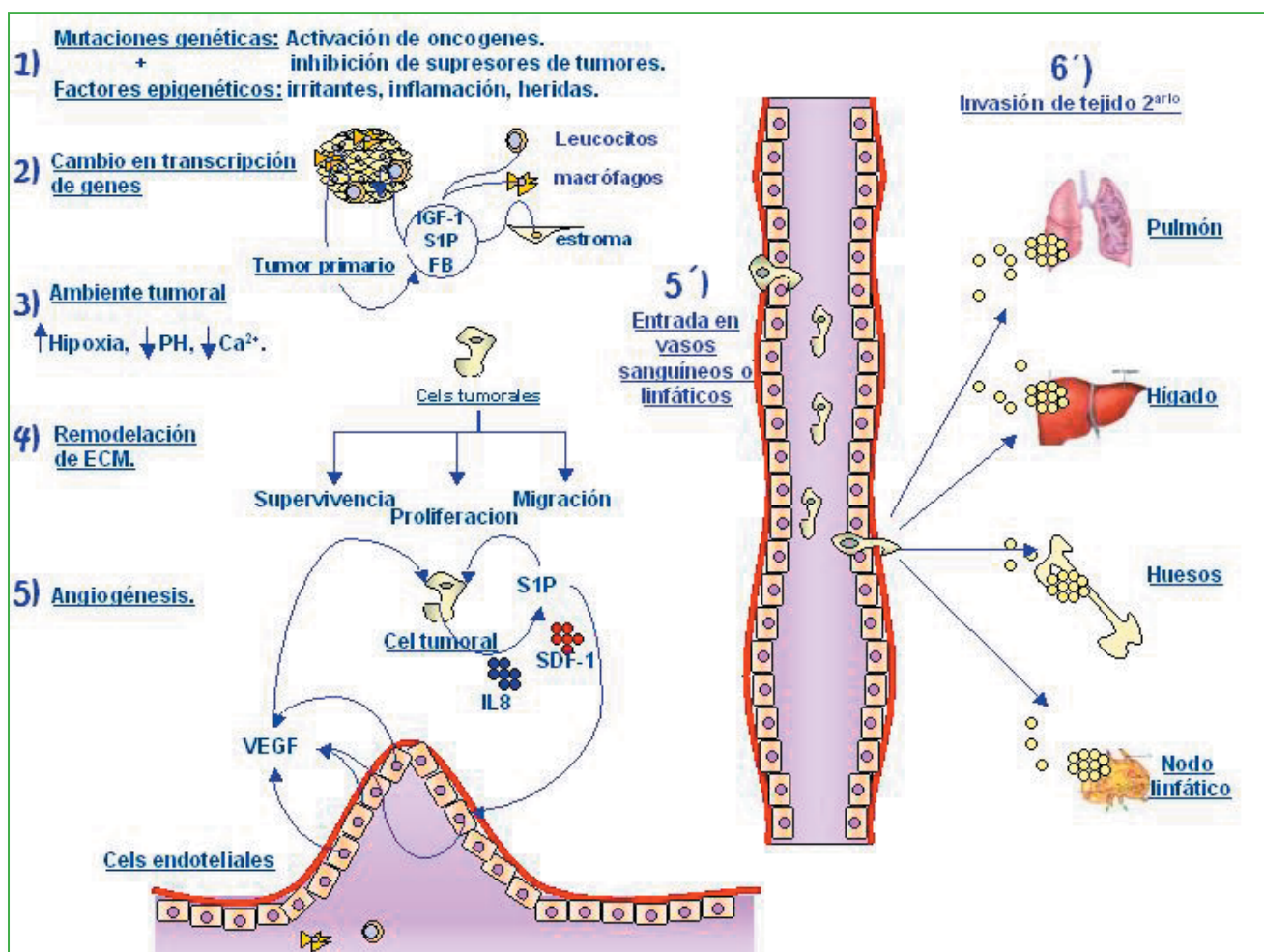


Figura D-4: Esquema representativo de distintos estadios críticos en la formación del tumor primario y su progresión a tumor metastático. Se muestran los cambios requeridos en cada una de las fases, tanto en las células que forman el tumor primario como del estroma, endoteliales y de tejidos lejanos al entorno tumoral.

sobre la migración/ invasión. La progresión tumoral es un proceso muy complejo en el que las células van adquiriendo ventajas proliferativas y perdiendo las características morfológicas y genéticas del tejido de origen (fig D-4). Dentro del foco primario, las células tumorales experimentan condiciones heterogéneas, ya que se establecen diversos gradientes dentro del tumor en cuanto a disponibilidad de oxígeno, nutrientes y factores secretados por las células del estroma. Así, las células del tumor sometidas a más estrés hipóxico activarían programas angiogénicos y seleccionarían propiedades que confieran mayor motilidad y capacidad de evasión. La expresión de GRK2 podría oscilar también según las necesidades del tumor y de las células que lo forman, para conferir propiedades proliferativas y migratorias. Datos previos de nuestro laboratorio sugieren que las células que expresan mayores cantidades de GRK2 en ciertos tumores sólidos, como tumores de piel en estadios iniciales, se localizan principalmente en el interior del foco primario, mientras que disminuyen en la periferia y en frentes de invasión con células menos diferenciadas (Alvarado y Rivas, en preparación). Cabe destacar también que datos preliminares de nuestro laboratorio sugieren que la expresión de GRK2 puede estar modulada por

el factor HIF- $\alpha$ , el cual se expresa notablemente en las células “interiores” del tumor.

En resumen, las alteraciones en los niveles de actividad y/o de expresión de GRK2 pueden ser relevantes en cáncer de mama y en distintos tipos de cáncer, por afectar a procesos esenciales de la célula, como consecuencia de su interacción funcional con diversas proteínas y sistemas de señalización relacionadas con procesos tumorales. Esta noción se ve reforzada por datos recientes en tumores de tiroides (Metaye, 2002), gliomas (Gray, 2001; Willets, 1999), melanomas (Sanchez-Laorden, 2007), de próstata (Prowatke, 2007) o de ovario (King, 2003), en los que se ha detectado asimismo una mayor presencia de la quinasa GRK2. Nuestros resultados indican que el aumento de GRK2 puede desempeñar un papel activo en algún estadio de la transformación neoplásica y constituir una posible diana terapéutica.



## CONCLUSIONES



**1.-** La degradación de la quinasa de receptores acoplados a proteínas G, GRK2, se regula activamente por la vía del proteasoma de manera dependiente de ubiquitilación. Es un proceso complejo y está regulado por la estimulación de receptores GPCRs, que aceleran el reciclaje basal de la quinasa. La ligasa Mdm2 es esencial en el mantenimiento del reciclaje basal y estimulado de GRK2, mientras que la función adaptadora de la molécula  $\beta$ -arrestina lo es en el reciclaje estimulado de la proteína. La interacción directa de Mdm2 con GRK2 y la consiguiente modificación de la quinasa por ubiquitilación en las lisinas 19, 20, 21, 30 y 31 son clave en el reciclaje constitutivo o basal de la proteína GRK2. La presencia de  $\beta$ -arrestina facilita la interacción de Mdm2 con GRK2 en los macrocomplejos de receptores activados en la membrana plasmática, potenciando la degradación de la quinasa y contribuyendo al recambio estimulado de GRK2.

**2.-** La degradación estimulada por GPCRs de GRK2 puede darse también de forma independiente de Mdm2, en procesos que implican la proteólisis de GRK2 tras su fosforilación por diversas quinasas dependiente de  $\beta$ -arrestinas. Se ha identificado que la ligasa Hakai puede promover la degradación de GRK2 tras su fosforilación en residuos de tirosinas .

**3.-** El control de la estabilidad de GRK2 como resultado de cambios en la funcionalidad de Mdm2 constituye un mecanismo clave en la modulación de la expresión de GRK2 en diversos contextos de señalización celular. La estimulación del receptor IGF-1R en distintos tipos celulares no transformados y en líneas celulares de carcinomas de mama y melanoma promueve la activación de la vía PI3K/AKT y la fosforilación dependiente de AKT de las serinas 166 y 186 de Mdm2. Esta modificación facilita la localización nuclear de la ligasa, impidiendo su acceso a GRK2 y promoviendo la acumulación de la proteína como consecuencia de una reducida degradación. Asimismo, los niveles de expresión de GRK2 se encuentran incrementados en una proporción significativa de muestras de pacientes con cáncer de mama, observándose una correlación positiva con el grado de activación de AKT, con el grado de diferenciación, y metástasis, que sugieren un papel activo de GRK2 en procesos de transformación neoplásica.

**4.-** La presencia de GRK2 afecta a procesos celulares clave en la transformación celular. Así, GRK2 modula positivamente la migración de células epiteliales transformadas y no transformadas en respuesta a gradientes de señales quimiotácticas relevantes en la progresión tumoral, como heregulina, S1P o IGF-1. Asimismo, la disminución de los niveles de GRK2 reduce la capacidad invasiva de líneas celulares de cáncer de mama y melanoma metastáticos. Por otra parte, los niveles de GRK2 afectan también a la tasa de proliferación celular en células epiteliales de mama transformadas MCF-7. Ello sugiere que la inhibición de la expresión de GRK2 en carcinomas caracterizados por una amplificación del eje señalizador PI3K/AKT, o por contextos de señalización que promueven el desacoplamiento de Mdm2 con GRK2, puede contribuir a la atenuación de la proliferación o la migración/ invasión en determinados estadios de la progresión del tumor y representar una potencial diana terapéutica.

## BIBLIOGRAFÍA





vation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11406-11 (2003).

**B**a, Y. H. & Li, H. P. [Advances in study of murine double minute 2/p53 passway with breast cancer]. *Beijing Da Xue Xue Bao* 38, 551-4 (2006).

Bader, N., Jung, T. & Grune, T. The proteasome and its role in nuclear protein maintenance. *Exp Gerontol* (2007).

Baldwin, J. M. The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *Embo J* 12, 1693-703 (1993).

Bardos, J. I., Chau, N. M. & Ashcroft, M. Growth factor-mediated induction of HDM2 positively regulates hypoxia-inducible factor 1alpha expression. *Mol Cell Biol* 24, 2905-14 (2004).

Barki-Harrington, L., Luttrell, L. M. & Rockman, H. A. Dual inhibition of beta-adrenergic and angiotensin II receptors by a single antagonist: a functional role for receptor-receptor interaction in vivo. *Circulation* 108, 1611-8 (2003).

Barriere, H., Nemes, C., Du, K. & Lukacs, G. L. Plasticity of Poly-Ubiquitin Recognition as Lysosomal Targeting Signals by the Endosomal Sorting Machinery. *Mol Biol Cell* (2007).

Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. & Seemuller, E. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92, 367-80 (1998).

Beaulieu, J. M. & Caron, M. G. Beta-arrestin goes nuclear. *Cell* 123, 755-7 (2005).

Benovic, J. L. Novel beta2-adrenergic receptor signaling pathways. *J Allergy Clin Immunol* 110, S229-35 (2002).

Benovic, J. L. & Marchese, A. A new key in breast cancer metastasis. *Cancer Cell* 6, 429-30 (2004).

Bergers, G., Song, S., Meyer-Morse, N., Bergsland, E. & Hanahan, D. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* 111, 1287-95 (2003).

Bernardi, R. et al. PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus. *Nat Cell Biol* 6, 665-72 (2004).

Bhat, K. P., Itahana, K., Jin, A. & Zhang, Y. Essential role of ribosomal protein L11 in mediating growth inhibition-induced p53 activation. *Embo J* 23, 2402-12 (2004).

**A**mmon-Treiber, S. & Holtt, V. Morphine-induced changes of gene expression in the brain. *Addict Biol* 10, 81-9 (2005).

Aragay, A. M. et al. G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2): mechanisms of regulation and physiological functions. *FEBS Lett* 430, 37-40 (1998).

Araki, R. et al. Enhanced phosphorylation of p53 serine 18 following DNA damage in DNA-dependent protein kinase catalytic subunit-deficient cells. *Cancer Res* 59, 3543-6 (1999).

Argentini, M., Barboule, N. & Wasylyk, B. The contribution of the RING finger domain of MDM2 to cell cycle progression. *Oncogene* 19, 3849-57 (2000).

Ashcroft, M. et al. Phosphorylation of HDM2 by Akt. *Oncogene* 21, 1955-62 (2002).

Azzi, M. et al. Beta-arrestin-mediated acti-

- Bhattacharya, M. et al. Beta-arrestins regulate a Ral-GDS Ral effector pathway that mediates cytoskeletal reorganization. *Nat Cell Biol* 4, 547-55 (2002).
- Bockaert, J. & Pin, J. P. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J* 18, 1723-9 (1999).
- Bond, G. L., Hu, W. & Levine, A. J. MDM2 is a central node in the p53 pathway: 12 years and counting. *Curr Cancer Drug Targets* 5, 3-8 (2005).
- Brignone, C., Bradley, K. E., Kisselev, A. F. & Grossman, S. R. A post-ubiquitination role for MDM2 and hHR23A in the p53 degradation pathway. *Oncogene* 23, 4121-9 (2004).
- Burgueno, J. et al. The adenosine A2A receptor interacts with the actin-binding protein alpha-actinin. *J Biol Chem* 278, 37545-52 (2003).
- Burton, J. L. & Solomon, M. J. D box and KEN box motifs in budding yeast Hsl1p are required for APC-mediated degradation and direct binding to Cdc20p and Cdh1p. *Genes Dev* 15, 2381-95 (2001).
- Bychkov, E. R., Gurevich, V. V., Joyce, J. N., Benovic, J. L. & Gurevich, E. V. Arrestins and two receptor kinases are upregulated in Parkinson's disease with dementia. *Neurobiol Aging* (2006).
- Cant, S. H. & Pitcher, J. A. G protein-coupled receptor kinase 2-mediated phosphorylation of ezrin is required for G protein-coupled receptor-dependent reorganization of the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 16, 3088-99 (2005).
- Carman, C. V. et al. Mutational analysis of Gbetagamma and phospholipid interaction with G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem* 275, 10443-52 (2000).
- Carman, C. V. & Benovic, J. L. G-protein-coupled receptors: turn-ons and turn-offs. *Curr Opin Neurobiol* 8, 335-44 (1998).
- Carman, C. V., Lisanti, M. P. & Benovic, J. L. Regulation of G protein-coupled receptor kinases by caveolin. *J Biol Chem* 274, 8858-64 (1999).
- Carman, C. V. et al. Selective regulation of Galpha(q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J Biol Chem* 274, 34483-92 (1999).
- Carman, C. V., Som, T., Kim, C. M. & Benovic, J. L. Binding and phosphorylation of tubulin by G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem* 273, 20308-16 (1998).
- Carpenter, G. ErbB-4: mechanism of action and biology. *Exp Cell Res* 284, 66-77 (2003).
- Carter, O., Bailey, G. S. & Dashwood, R. H. The dietary phytochemical chlorophyllin alters E-cadherin and beta-catenin expression in human colon cancer cells. *J Nutr* 134, 3441S-3444S (2004).
- Carter, S., Bischof, O., Dejean, A. & Vo-usden, K. H. C-terminal modifications regulate MDM2 dissociation and nuclear export of p53. *Nat Cell Biol* 9, 428-35 (2007).
- Chang, C. J., Freeman, D. J. & Wu, H. PTEN regulates Mdm2 expression through the P1 promoter. *J Biol Chem* 279, 29841-8 (2004).
- Chang, D. L. et al. ARF promotes accumulation of retinoblastoma protein through inhibition of MDM2. *Oncogene* 26, 4627-34 (2007).
- Chau, V. et al. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 243, 1576-83 (1989).
- Chehab, N. H., Malikzay, A., Appel, M. & Halazonetis, T. D. Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev* 14, 278-88 (2000).
- Ciechanover, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 79, 13-21 (1994).
- Ciechanover, A., Heller, H., Elias, S., Haas, A. L. & Hershko, A. ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1365-8 (1980).
- Ciechanover, A. & Hershko, A. Early effects of serum on phospholipid metabolism in untransformed and oncogenic virus-transformed cultured fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 73, 85-91 (1976).
- Claing, A., Laporte, S. A., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol* 66, 61-79 (2002).
- Cobelens, P. M. et al. Hydrogen peroxide impairs GRK2 translation via a calpain-dependent and cdk1-mediated pathway. *Cell Signal* 19, 269-77 (2007).
- Collins, G. A. & Tansey, W. P. The proteasome: a utility tool for transcription? *Curr Opin Genet Dev* 16, 197-202 (2006).
- Coutts, A. S. & La Thangue, N. B. Mdm2 widens its repertoire. *Cell Cycle* 6, 827-9 (2007).

Dai, M. S. et al. Ribosomal protein L23 activates p53 by inhibiting MDM2 function in response to ribosomal perturbation but not to translation inhibition. *Mol Cell Biol* 24, 7654-68 (2004).

Danovi, D. et al. Amplification of Mdmx (or Mdm4) directly contributes to tumor formation by inhibiting p53 tumor suppressor activity. *Mol Cell Biol* 24, 5835-43 (2004).

Datto, M. & Wang, X. F. Ubiquitin-mediated degradation a mechanism for fine-tuning TGF-beta signaling. *Cell* 121, 2-4 (2005).

Daujat, S., Neel, H. & Piette, J. MDM2: life without p53. *Trends Genet* 17, 459-64 (2001).

Day, P. W., Carman, C. V., Sterne-Marr, R., Benovic, J. L. & Wedegaertner, P. B. Differential interaction of GRK2 with members of the G alpha q family. *Biochemistry* 42, 9176-84 (2003).

Day, P. W. et al. Characterization of the GRK2 binding site of Galphaq. *J Biol Chem* 279, 53643-52 (2004).

Day, P. W., Wedegaertner, P. B. & Benovic, J. L. Analysis of G-protein-coupled receptor kinase RGS homology domains. *Methods Enzymol* 390, 295-310 (2004).

DeFea, K. A. Stop that cell! Beta-arrestin-dependent chemotaxis: a tale of localized actin assembly and receptor desensitization. *Annu Rev Physiol* 69, 535-60 (2007).

DeGraff, J. L., Gagnon, A. W., Benovic, J. L. & Orsini, M. J. Role of arrestins in endocytosis and signaling of alpha2-adrenergic receptor subtypes. *J Biol Chem* 274, 11253-9 (1999).

DeGraff, J. L., Gurevich, V. V. & Benovic, J. L. The third intracellular loop of alpha 2-adrenergic receptors determines subtype specificity of arrestin interaction. *J Biol Chem* 277, 43247-52 (2002).

Demartino, G. N. & Gillette, T. G. Proteasomes: machines for all reasons. *Cell* 129, 659-62 (2007).

Derynck, R., Akhurst, R. J. & Balmain, A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 29, 117-29 (2001).

DeWire, S. M., Ahn, S., Lefkowitz, R. J. & Shenoy, S. K. Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol* 69, 483-510 (2007).

Dinudom, A. et al. The kinase Grk2 regulates Nedd4/Nedd4-2-dependent control of epithelial Na<sup>+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11886-90 (2004).

Dorsam, R. T. & Gutkind, J. S. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 7, 79-94 (2007).

Drake, M. T., Shenoy, S. K. & Lefkowitz, R. J. Trafficking of G protein-coupled receptors. *Circ Res* 99, 570-82 (2006).

Duong, V. et al. Differential regulation of estrogen receptor alpha turnover and transactivation by Mdm2 and stress-inducing agents. *Cancer Res* 67, 5513-21 (2007).

Efeyan, A; Serrano, M. "p53:Guardian of the genome and policeman of the oncogenes". *Cell Cycle* 6:9, 1006-1010 (2007).

Eichmann, T. et al. The amino-terminal domain of G-protein-coupled receptor kinase 2 is a regulatory Gbeta gamma binding site. *J Biol Chem* 278, 8052-7 (2003).

Elorza, A., Penela, P., Sarnago, S. & Mayor, F., Jr. MAPK-dependent degradation of G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem* 278, 29164-73 (2003).

Elorza, A., Sarnago, S. & Mayor, F., Jr. Agonist-dependent modulation of G protein-coupled receptor kinase 2 by mitogen-activated protein kinases. *Mol Pharmacol* 57, 778-83 (2000).

El-Shewy, H. M. et al. Insulin-like growth factors mediate heterotrimeric G protein-dependent ERK1/2 activation by transactivating sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem* 281, 31399-407 (2006).

Fakharzadeh, S. S., Trusko, S. P. & George, D. L. Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *Embo J* 10, 1565-9 (1991).

Fang, S., Jensen, J. P., Ludwig, R. L., Vo-usden, K. H. & Weissman, A. M. Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J Biol Chem* 275, 8945-51 (2000).

Feng, J. et al. Stabilization of Mdm2 via decreased ubiquitination is mediated by protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation. *J Biol Chem* 279, 35510-7 (2004).

Foo, R. S., Chan, L. K., Kitsis, R. N. & Bennett, M. R. Ubiquitination and degradation of the anti-apoptotic protein ARC by MDM2. *J Biol Chem* 282, 5529-35 (2007).

Frame, M. C. Newest findings on the oldest oncogene; how activated src does it. *J Cell Sci* 117, 989-98 (2004).

Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G. & Schioth, H. B. The G-protein-coupled re-

ceptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63, 1256-72 (2003).

Freedman, N. J. et al. Phosphorylation of the platelet-derived growth factor receptor-beta and epidermal growth factor receptor by G protein-coupled receptor kinase-2. Mechanisms for selectivity of desensitization. *J Biol Chem* 277, 48261-9 (2002).

Fujita, Y. et al. Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol* 4, 222-31 (2002).

Gaggioli, C. et al. Tumor-derived fibronectin is involved in melanoma cell invasion and regulated by V600E B-Raf signaling pathway. *J Invest Dermatol* 127, 400-10 (2007).

Gagnon, A. W., Kallal, L. & Benovic, J. L. Role of clathrin-mediated endocytosis in agonist-induced down-regulation of the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 273, 6976-81 (1998).

Gaidarov, I., Krupnick, J. G., Falck, J. R., Benovic, J. L. & Keen, J. H. Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding. *Embo J* 18, 871-81 (1999).

Garcia-Higuera, I. et al. Association of the regulatory beta-adrenergic receptor kinase with rat liver microsomal membranes. *J Biol Chem* 269, 1348-55 (1994).

Georgakis, G. V. et al. Inhibition of the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt promotes G1 cell cycle arrest and apoptosis in Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 132, 503-11 (2006).

George, D. Platelet-derived growth factor receptors: a therapeutic target in solid tumors. *Semin Oncol* 28, 27-33 (2001).

Girnita, L. et al. {beta}-Arrestin is crucial for ubiquitination and down-regulation of the insulin-like growth factor-1 receptor by acting as adaptor for the MDM2 E3 ligase. *J Biol Chem* 280, 24412-9 (2005).

Girnita, L. et al. Beta-arrestin and Mdm2 mediate IGF-1 receptor-stimulated ERK activation and cell cycle progression. *J Biol Chem* 282, 11329-38 (2007).

Glickman, M. H., Rubin, D. M., Fried, V. A. & Finley, D. The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol* 18, 3149-62 (1998).

Glockzin, S., Ogi, F. X., Hengstermann, A., Scheffner, M. & Blattner, C. Involvement of the

DNA repair protein hHR23 in p53 degradation. *Mol Cell Biol* 23, 8960-9 (2003).

Glutzer, M., Murray, A. W. & Kirschner, M. W. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132-8 (1991).

Goldberg, A. L., Cascio, P., Saric, T. & Rock, K. L. The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol Immunol* 39, 147-64 (2002).

Goldberg, Z. et al. Tyrosine phosphorylation of Mdm2 by c-Abl: implications for p53 regulation. *Embo J* 21, 3715-27 (2002).

Goodman, O. B., Jr., Krupnick, J. G., Gurevich, V. V., Benovic, J. L. & Keen, J. H. Arrestin/clathrin interaction. Localization of the arrestin binding locus to the clathrin terminal domain. *J Biol Chem* 272, 15017-22 (1997).

Goodman, O. B., Jr. et al. Role of arrestins in G-protein-coupled receptor endocytosis. *Adv Pharmacol* 42, 429-33 (1998).

Gray, J. A. et al. Cell-type specific effects of endocytosis inhibitors on 5-hydroxytryptamine(2A) receptor desensitization and resensitization reveal an arrestin-, GRK2-, and GRK5-independent mode of regulation in human embryonic kidney 293 cells. *Mol Pharmacol* 60, 1020-30 (2001).

Grewal, J. S., Luttrell, L. M. & Raymond, J. R. G protein-coupled receptors desensitize and down-regulate epidermal growth factor receptors in renal mesangial cells. *J Biol Chem* 276, 27335-44 (2001).

Gros, R., Benovic, J. L., Tan, C. M. & Feldman, R. D. G-protein-coupled receptor kinase activity is increased in hypertension. *J Clin Invest* 99, 2087-93 (1997).

Gros, R. et al. G-Protein-coupled receptor kinase activity in hypertension: increased vascular and lymphocyte G-protein receptor kinase-2 protein expression. *Hypertension* 35, 38-42 (2000).

Gros, R. et al. G-protein-coupled receptor kinase expression in hypertension. *Clin Pharmacol Ther* 65, 545-51 (1999).

Grossman, S. R. et al. Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science* 300, 342-4 (2003).

Gu, J. et al. Mutual dependence of MDM2 and MDMX in their functional inactivation of p53. *J Biol Chem* 277, 19251-4 (2002).

Gu, J., Nie, L., Kawai, H. & Yuan, Z. M.



Subcellular distribution of p53 and p73 are differentially regulated by MDM2. *Cancer Res* 61, 6703-7 (2001).

Guo, W. & Giancotti, F. G. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 816-26 (2004).

Gurevich, E. V., Benovic, J. L. & Gurevich, V. V. Arrestin2 expression selectively increases during neural differentiation. *J Neurochem* 91, 1404-16 (2004).

Gurevich, V. V. & Benovic, J. L. Arrestin: mutagenesis, expression, purification, and functional characterization. *Methods Enzymol* 315, 422-37 (2000).

Gurevich, V. V., Pals-Rylaarsdam, R., Benovic, J. L., Hosey, M. M. & Onorato, J. J. Agonist-receptor-arrestin, an alternative ternary complex with high agonist affinity. *J Biol Chem* 272, 28849-52 (1997).

Hagan, S., Garcia, R., Dhillon, A. & Kolch, W. Raf kinase inhibitor protein regulation of raf and MAPK signaling. *Methods Enzymol* 407, 248-59 (2005).

Haglund, K. et al. Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol* 5, 461-6 (2003).

Hait, N. C., Oskeritzian, C. A., Paugh, S. W., Milstien, S. & Spiegel, S. Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochim Biophys Acta* 1758, 2016-26 (2006).

Hansen, J. L., Theilade, J., Aplin, M. & Sheikh, S. P. Role of G-protein-coupled receptor kinase 2 in the heart-do regulatory mechanisms open novel therapeutic perspectives? *Trends Cardiovasc Med* 16, 169-77 (2006).

Hanson, S. M. et al. Arrestin mobilizes signaling proteins to the cytoskeleton and redirects their activity. *J Mol Biol* 368, 375-87 (2007).

Heldin, C. H., Ostman, A. & Ronnstrand, L. Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta* 1378, F79-113 (1998).

Hershko, A. & Ciechanover, A. Mechanisms of intracellular protein breakdown. *Annu Rev Biochem* 51, 335-64 (1982).

Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A. L. & Rose, I. A. Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1783-6 (1980).

Hershko, A., Ciechanover, A. & Rose, I. A. Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 3107-10 (1979).

Hershko, A., Heller, H., Elias, S. & Ciechanover, A. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem* 258, 8206-14 (1983).

Hess, D. T., Matsumoto, A., Kim, S. O., Marshall, H. E. & Stamler, J. S. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 150-66 (2005).

Hicke, L. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 195-201 (2001).

Hicke, L. A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell* 106, 527-30 (2001).

Hicke, L. & Dunn, R. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 141-72 (2003).

Hildreth, K. L. et al. Phosphorylation of the platelet-derived growth factor receptor-beta by G protein-coupled receptor kinase-2 reduces receptor signaling and interaction with the Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor. *J Biol Chem* 279, 41775-82 (2004).

Ho, J., Chen, H. & Lebrun, J. J. Novel dominant negative Smad antagonists to TGFbeta signaling. *Cell Signal* 19, 1565-74 (2007).

Ho, J. et al. The G protein-coupled receptor kinase-2 is a TGFbeta-inducible antagonist of TGFbeta signal transduction. *Embo J* 24, 3247-58 (2005).

Hoefen, R. J., Berk, B. C. The multifunctional GIT family of proteins. *J Cell Sci* 119, 1469-75 (2006).

Hoeller, D. et al. E3-independent monoubiquitination of ubiquitin-binding proteins. *Mol Cell* 26, 891-8 (2007).

Honda, R. & Yasuda, H. Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase. *Oncogene* 19, 1473-6 (2000).

Horn, F. & Vriend, G. G protein-coupled receptors in silico. *J Mol Med* 76, 464-8 (1998).

Huang, J., Zhou, H., Mahavadi, S., Sriwai, W. & Murthy, K. S. Inhibition of Galphag-dependent PLC-beta1 activity by PKG and PKA is mediated by phosphorylation of RGS4 and GRK2. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C200-8 (2007).



Iaccarino, G., Rockman, H. A., Shotwell, K. F., Tomhave, E. D. & Koch, W. J. Myocardial overexpression of GRK3 in transgenic mice: evidence for in vivo selectivity of GRKs. *Am J Physiol* 275, H1298-306 (1998).

Imamura, T. et al. beta-Arrestin-mediated recruitment of the Src family kinase Yes mediates endothelin-1-stimulated glucose transport. *J Biol Chem* 276, 43663-7 (2001).

Iwakuma, T. & Lozano, G. MDM2, an introduction. *Mol Cancer Res* 1, 993-1000 (2003).

Jaber, M. et al. Essential role of beta-adrenergic receptor kinase 1 in cardiac development and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12974-9 (1996).

Jackson, M. W. & Berberich, S. J. MdmX protects p53 from Mdm2-mediated degradation. *Mol Cell Biol* 20, 1001-7 (2000).

Jackson, M. W. et al. Hdm2 nuclear export, regulated by insulin-like growth factor-I/ MAPK/p90Rsk signaling, mediates the transformation of human cells. *J Biol Chem* 281, 16814-20 (2006).

Jiang, X., Benovic, J. L. & Wedegaertner, P. B. Plasma Membrane and Nuclear Localization of G Protein-coupled Receptor Kinase 6A. *Mol Biol Cell* (2007).

Jimenez-Sainz, M. C. et al. G protein-coupled receptor kinase 2 negatively regulates chemokine signaling at a level downstream from G protein subunits. *Mol Biol Cell* 17, 25-31 (2006).

Jin, Y., Lee, H., Zeng, S. X., Dai, M. S. & Lu, H. MDM2 promotes p21waf1/cip1 proteasomal turnover independently of ubiquitylation. *Embo J* 22, 6365-77 (2003).

Jin, Y., Zeng, S. X., Dai, M. S., Yang, X. J. & Lu, H. MDM2 inhibits PCAF (p300/CREB-binding protein-associated factor)-mediated p53 acetylation. *J Biol Chem* 277, 30838-43 (2002).

Jin, Y., Zeng, S. X., Lee, H. & Lu, H. MDM2 mediates p300/CREB-binding protein-associated factor ubiquitination and degradation. *J Biol Chem* 279, 20035-43 (2004).

Johnson, L. R., Scott, M. G. & Pitcher, J. A. G protein-coupled receptor kinase 5 contains a DNA-binding nuclear localization sequence. *Mol Cell Biol* 24, 10169-79 (2004).

Jung, T., Bader, N. & Grune, T. Oxidized proteins: intracellular distribution and recognition by the proteasome. *Arch Biochem Biophys* 462, 231-7 (2007).

Kabbani, N., Negyessy, L., Lin, R., Goldman-Rakic, P. & Levenson, R. Interaction with neuronal calcium sensor NCS-1 mediates desensitization of the D2 dopamine receptor. *J Neurosci* 22, 8476-86 (2002).

Kallal, L. & Benovic, J. L. Using green fluorescent proteins to study G-protein-coupled receptor localization and trafficking. *Trends Pharmacol Sci* 21, 175-80 (2000).

Kallal, L., Gagnon, A. W., Penn, R. B. & Benovic, J. L. Visualization of agonist-induced sequestration and down-regulation of a green fluorescent protein-tagged beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 273, 322-8 (1998).

Kang, J. et al. A nuclear function of beta-arrestin1 in GPCR signaling: regulation of histone acetylation and gene transcription. *Cell* 123, 833-47 (2005).

Kannemeier, C., Liao, R. & Sun, P. The RING finger domain of MDM2 is essential for MDM2-mediated TGF-beta resistance. *Mol Biol Cell* 18, 2367-77 (2007).

Karnoub, A. E. et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449, 557-63 (2007).

Katayama, H. et al. Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat Genet* 36, 55-62 (2004).

Kawai, H., Lopez-Pajares, V., Kim, M. M., Wiederschain, D. & Yuan, Z. M. RING domain-mediated interaction is a requirement for MDM2's E3 ligase activity. *Cancer Res* 67, 6026-30 (2007).

Kawai, H., Nie, L., Wiederschain, D. & Yuan, Z. M. Dual role of p300 in the regulation of p53 stability. *J Biol Chem* 276, 45928-32 (2001).

Kawai, H. et al. DNA damage-induced MDMX degradation is mediated by MDM2. *J Biol Chem* 278, 45946-53 (2003).

Kawai, H., Wiederschain, D. & Yuan, Z. M. Critical contribution of the MDM2 acidic domain to p53 ubiquitination. *Mol Cell Biol* 23, 4939-47 (2003).

Khoa, N. D., Postow, M., Danielsson, J. & Cronstein, B. N. Tumor necrosis factor-alpha prevents desensitization of G-protein-coupled receptors by regulating GRK2 association with the plasma membrane. *Mol Pharmacol* 69, 1311-9 (2006).

Kim, H. T. et al. Certain pairs of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) and ubiquitin-protein

ligases (E3s) synthesize nondegradable forked ubiquitin chains containing all possible isopeptide linkages. *J Biol Chem* 282, 17375-86 (2007).

Kim, J. et al. Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1442-7 (2005).

Kim, M. M., Wiederschain, D., Kennedy, D., Hansen, E. & Yuan, Z. M. Modulation of p53 and MDM2 activity by novel interaction with Ras-GAP binding proteins (G3BP). *Oncogene* 26, 4209-15 (2007).

Kim, Y. M., Barak, L. S., Caron, M. G. & Benovic, J. L. Regulation of arrestin-3 phosphorylation by casein kinase II. *J Biol Chem* 277, 16837-46 (2002).

Kim, Y. M. & Benovic, J. L. Differential roles of arrestin-2 interaction with clathrin and adaptor protein 2 in G protein-coupled receptor trafficking. *J Biol Chem* 277, 30760-8 (2002).

King, D. W. et al. Differential expression of GRK isoforms in nonmalignant and malignant human granulosa cells. *Endocrine* 22, 135-42 (2003).

Kisselev, A. F., Songyang, Z. & Goldberg, A. L. Why does threonine, and not serine, function as the active site nucleophile in proteasomes? *J Biol Chem* 275, 14831-7 (2000).

Knippschild, U. et al. The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal* 17, 675-89 (2005).

Kobilka, B. K. & Deupi, X. Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28, 397-406 (2007).

Koegl, M. et al. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96, 635-44 (1999).

Kohout, T. A. & Lefkowitz, R. J. Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol Pharmacol* 63, 9-18 (2003).

Kozasa, T. Regulation of G protein-mediated signal transduction by RGS proteins. *Life Sci* 68, 2309-17 (2001).

Kozasa, T. The structure of GRK2-G beta gamma complex: intimate association of G-protein signaling modules. *Trends Pharmacol Sci* 25, 61-3 (2004).

Krasel, C. et al. Phosphorylation of GRK2 by protein kinase C abolishes its inhibition by calmodulin. *J Biol Chem* 276, 1911-5 (2001).

Krupnick, J. G. & Benovic, J. L. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38, 289-319 (1998).

Krupnick, J. G., Goodman, O. B., Jr., Keen, J. H. & Benovic, J. L. Arrestin/clathrin interaction. Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxy terminus. *J Biol Chem* 272, 15011-6 (1997).

Krupnick, J. G., Santini, F., Gagnon, A. W., Keen, J. H. & Benovic, J. L. Modulation of the arrestin-clathrin interaction in cells. Characterization of beta-arrestin dominant-negative mutants. *J Biol Chem* 272, 32507-12 (1997).

Lacroix, M. & Leclercq, G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat* 83, 249-89 (2004).

Lahav, G. et al. Dynamics of the p53-Mdm2 feedback loop in individual cells. *Nat Genet* 36, 147-50 (2004).

Lai, Z. et al. Human mdm2 mediates multiple mono-ubiquitination of p53 by a mechanism requiring enzyme isomerization. *J Biol Chem* 276, 31357-67 (2001).

Lai, Z. et al. Differentiation of Hdm2-mediated p53 ubiquitination and Hdm2 autoubiquitination activity by small molecular weight inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14734-9 (2002).

Larsson, O., Girnita, A. & Girnita, L. Role of insulin-like growth factor 1 receptor signalling in cancer. *Br J Cancer* 92, 2097-101 (2005).

Lecker, S. H., Goldberg, A. L. & Mitch, W. E. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol* 17, 1807-19 (2006).

Lefkowitz, R. J. & Shenoy, S. K. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308, 512-7 (2005).

Leosco, D. et al. Lymphocyte G-protein-coupled receptor kinase-2 is upregulated in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 415, 279-82 (2007).

Levav-Cohen, Y., Haupt, S. & Haupt, Y. Mdm2 in growth signaling and cancer. *Growth Factors* 23, 183-92 (2005).

Levay, K., Satpaev, D. K., Pronin, A. N., Benovic, J. L. & Slepak, V. Z. Localization of the sites for Ca<sup>2+</sup>-binding proteins on G protein-coupled receptor kinases. *Biochemistry* 37, 13650-9 (1998).

Li, A. G. et al. Mechanistic insights into ma-

intenance of high p53 acetylation by PTEN. *Mol Cell* 23, 575-87 (2006).

Li, J. G., Benovic, J. L. & Liu-Chen, L. Y. Mechanisms of agonist-induced down-regulation of the human kappa-opioid receptor: internalization is required for down-regulation. *Mol Pharmacol* 58, 795-801 (2000).

Limesand, K. H., Schwertfeger, K. L. & Anderson, S. M. MDM2 is required for suppression of apoptosis by activated Akt1 in salivary acinar cells. *Mol Cell Biol* 26, 8840-56 (2006).

Lin, F. T. et al. Phosphorylation of beta-arrestin2 regulates its function in internalization of beta(2)-adrenergic receptors. *Biochemistry* 41, 10692-9 (2002).

Lin, F. T. et al. Clathrin-mediated endocytosis of the beta-adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of beta-arrestin1. *J Biol Chem* 272, 31051-7 (1997).

Lin, H. K., Wang, L., Hu, Y. C., Altuwaijri, S. & Chang, C. Phosphorylation-dependent ubiquitylation and degradation of androgen receptor by Akt require Mdm2 E3 ligase. *Embo J* 21, 4037-48 (2002).

Linares, L. K., Hengstermann, A., Ciechanover, A., Muller, S. & Scheffner, M. HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12009-14 (2003).

Lindsten, K. et al. Mutant ubiquitin found in neurodegenerative disorders is a ubiquitin fusion degradation substrate that blocks proteasomal degradation. *J Cell Biol* 157, 417-27 (2002).

Lindstrom, M. S., Jin, A., Deisenroth, C., White Wolf, G. & Zhang, Y. Cancer-associated mutations in the MDM2 zinc finger domain disrupt ribosomal protein interaction and attenuate MDM2-induced p53 degradation. *Mol Cell Biol* 27, 1056-68 (2007).

Liu, L., Zhao, X., Pierre, S. V. & Askari, A. Association of PI3K/Akt Signaling Pathway with Digitalis-Induced Hypertrophy of Cardiac Myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* (2007).

Lodowski, D. T. et al. The role of G beta gamma and domain interfaces in the activation of G protein-coupled receptor kinase 2. *Biochemistry* 44, 6958-70 (2005).

Lombardi, M. S. et al. Oxidative stress decreases G protein-coupled receptor kinase 2 in lymphocytes via a calpain-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 62, 379-88 (2002).

Lombardi, M. S. et al. Decreased expression and activity of G-protein-coupled receptor

kinases in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis. *Faseb J* 13, 715-25 (1999).

Lombardi, M. S. et al. Down-regulation of GRK2 after oxygen and glucose deprivation in rat hippocampal slices: role of the PI3-kinase pathway. *J Neurochem* 102, 731-40 (2007).

Lorenz, K., Lohse, M. J. & Quitterer, U. Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2. *Nature* 426, 574-9 (2003).

Luo, J. & Benovic, J. L. G protein-coupled receptor kinase interaction with Hsp90 mediates kinase maturation. *J Biol Chem* 278, 50908-14 (2003).

Luttrell, L. M. Activation and targeting of mitogen-activated protein kinases by G-protein-coupled receptors. *Can J Physiol Pharmacol* 80, 375-82 (2002).

Luttrell, L. M. Transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Methods Mol Biol* 332, 3-49 (2006).

Luttrell, L. M. et al. Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 283, 655-61 (1999).

Luttrell, L. M. & Lefkowitz, R. J. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* 115, 455-65 (2002).

Ma, L. & Pei, G. Beta-arrestin signaling and regulation of transcription. *J Cell Sci* 120, 213-8 (2007).

Maki, C. G. Oligomerization is required for p53 to be efficiently ubiquitinated by MDM2. *J Biol Chem* 274, 16531-5 (1999).

Malmlof, M., Roudier, E., Hogberg, J. & Stenius, U. MEK-ERK-mediated phosphorylation of Mdm2 at Ser-166 in hepatocytes. Mdm2 is activated in response to inhibited Akt signaling. *J Biol Chem* 282, 2288-96 (2007).

Mandyam, C. D., Thakker, D. R., Christensen, J. L. & Standifer, K. M. Orphanin FQ/nociceptin-mediated desensitization of opioid receptor-like 1 receptor and mu opioid receptors involves protein kinase C: a molecular mechanism for heterologous cross-talk. *J Pharmacol Exp Ther* 302, 502-9 (2002).

Marchenko, N. D., Wolff, S., Erster, S., Becker, K. & Moll, U. M. Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation. *Embo J* 26, 923-34 (2007).



- Marchese, A. & Benovic, J. L. Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *J Biol Chem* 276, 45509-12 (2001).
- Marchese, A. & Benovic, J. L. Ubiquitination of G-protein-coupled receptors. *Methods Mol Biol* 259, 299-305 (2004).
- Marchese, A., Chen, C., Kim, Y. M. & Benovic, J. L. The ins and outs of G protein-coupled receptor trafficking. *Trends Biochem Sci* 28, 369-76 (2003).
- Marchese, A. et al. The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4. *Dev Cell* 5, 709-22 (2003).
- Mariggio, S. et al. Tyrosine phosphorylation of G-protein-coupled-receptor kinase 2 (GRK2) by c-Src modulates its interaction with Galphaq. *Cell Signal* 18, 2004-12 (2006).
- Martin, N. P., Lefkowitz, R. J. & Shenoy, S. K. Regulation of V2 vasopressin receptor degradation by agonist-promoted ubiquitination. *J Biol Chem* 278, 45954-9 (2003).
- Mashukova, A., Spehr, M., Hatt, H. & Neuhäus, E. M. Beta-arrestin2-mediated internalization of mammalian odorant receptors. *J Neurosci* 26, 9902-12 (2006).
- Matharu, A. L., Mundell, S. J., Benovic, J. L. & Kelly, E. Rapid agonist-induced desensitization and internalization of the A(2B) adenosine receptor is mediated by a serine residue close to the COOH terminus. *J Biol Chem* 276, 30199-207 (2001).
- Matkovich, S. J. et al. Cardiac-specific ablation of G-protein receptor kinase 2 redefines its roles in heart development and beta-adrenergic signaling. *Circ Res* 99, 996-1003 (2006).
- Maya, R. et al. ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev* 15, 1067-77 (2001).
- Mayo, L. D. & Donner, D. B. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11598-603 (2001).
- Mayo, L. D. & Donner, D. B. The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. *Trends Biochem Sci* 27, 462-7 (2002).
- Mayor, F., Jr., Penela, P. & Ruiz-Gomez, A. Role of G protein-coupled receptor kinase 2 and arrestins in beta-adrenergic receptor internalization. *Trends Cardiovasc Med* 8, 234-40 (1998).
- McDonald, P. H. et al. Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* 290, 1574-7 (2000).
- McDonald, P. H. et al. Identification of NSF as a beta-arrestin1-binding protein. Implications for beta2-adrenergic receptor regulation. *J Biol Chem* 274, 10677-80 (1999).
- McKeage, K. & Perry, C. M. Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2. *Drugs* 62, 209-43 (2002).
- Mekhlail, K. et al. Regulation of ubiquitin ligase dynamics by the nucleolus. *J Cell Biol* 170, 733-44 (2005).
- Meloni, A. R. et al. Smoothed signal transduction is promoted by G protein-coupled receptor kinase 2. *Mol Cell Biol* 26, 7550-60 (2006).
- Mendrysa, S. M. et al. mdm2 is critical for inhibition of p53 during lymphopoiesis and the response to ionizing irradiation. *Mol Cell Biol* 23, 462-72 (2003).
- Meng, L. H., Kohn, K. W. & Pommier, Y. Dose-response transition from cell cycle arrest to apoptosis with selective degradation of Mdm2 and p21WAF1/CIP1 in response to the novel anticancer agent, aminoflavone (NSC 686,288). *Oncogene* 26, 4806-16 (2007).
- Metaye, T., Menet, E., Guilhot, J. & Kraimps, J. L. Expression and activity of g protein-coupled receptor kinases in differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 3279-86 (2002).
- Meulmeester, E. et al. Critical role for a central part of Mdm2 in the ubiquitylation of p53. *Mol Cell Biol* 23, 4929-38 (2003).
- Midgley, C. A. et al. An N-terminal p14ARF peptide blocks Mdm2-dependent ubiquitination in vitro and can activate p53 in vivo. *Oncogene* 19, 2312-23 (2000).
- Milano, A., Iaffaioli, R. V. & Caponigro, F. The proteasome: a worthwhile target for the treatment of solid tumours? *Eur J Cancer* 43, 1125-33 (2007).
- Milano, S. K., Kim, Y. M., Stefano, F. P., Benovic, J. L. & Brenner, C. Nonvisual arrestin oligomerization and cellular localization are regulated by inositol hexakisphosphate binding. *J Biol Chem* 281, 9812-23 (2006).
- Milano, S. K., Pace, H. C., Kim, Y. M., Brenner, C. & Benovic, J. L. Scaffolding functions of arrestin-2 revealed by crystal structure and mutagenesis. *Biochemistry* 41, 3321-8 (2002).
- Miller, W. E. et al. beta-arrestin1 interacts

with the catalytic domain of the tyrosine kinase c-SRC. Role of beta-arrestin1-dependent targeting of c-SRC in receptor endocytosis. *J Biol Chem* 275, 11312-9 (2000).

Miller, W. E. et al. Identification of a motif in the carboxyl terminus of beta-arrestin2 responsible for activation of JNK3. *J Biol Chem* 276, 27770-7 (2001).

Milne, D. et al. A novel site of AKT-mediated phosphorylation in the human MDM2 oncoprotein. *FEBS Lett* 577, 270-6 (2004).

Milstien, S. & Spiegel, S. Targeting sphingosine-1-phosphate: a novel avenue for cancer therapeutics. *Cancer Cell* 9, 148-50 (2006).

Molnar, C., Holguin, H., Mayor, F., Jr., Ruiz-Gomez, A. & de Celis, J. F. The G protein-coupled receptor regulatory kinase GPRK2 participates in Hedgehog signaling in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7963-8 (2007).

Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D. & Levine, A. J. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69, 1237-45 (1992).

Moore, C. A., Milano, S. K. & Benovic, J. L. Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol* 69, 451-82 (2007).

Moumen, A., Patane, S., Porras, A., Dono, R. & Maina, F. Met acts on Mdm2 via mTOR to signal cell survival during development. *Development* 134, 1443-51 (2007).

Muller, S. et al. c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 275, 13321-9 (2000).

Mundell, S. J. & Benovic, J. L. Selective regulation of endogenous G protein-coupled receptors by arrestins in HEK293 cells. *J Biol Chem* 275, 12900-8 (2000).

Mundell, S. J., Benovic, J. L. & Kelly, E. A dominant negative mutant of the G protein-coupled receptor kinase 2 selectively attenuates adenosine A2 receptor desensitization. *Mol Pharmacol* 51, 991-8 (1997).

Mundell, S. J. & Kelly, E. Evidence for co-expression and desensitization of A2a and A2b adenosine receptors in NG108-15 cells. *Biochem Pharmacol* 55, 595-603 (1998).

Mundell, S. J., Luty, J. S., Willets, J., Benovic, J. L. & Kelly, E. Enhanced expression of G protein-coupled receptor kinase 2 selectively increases the sensitivity of A2A adenosine receptors to agonist-induced desensitization. *Br J Pharmacol* 125, 347-56 (1998).

Mundell, S. J., Matharu, A. L., Kelly, E. & Benovic, J. L. Arrestin isoforms dictate differential kinetics of A2B adenosine receptor trafficking. *Biochemistry* 39, 12828-36 (2000).

Mundell, S. J., Orsini, M. J. & Benovic, J. L. Characterization of arrestin expression and function. *Methods Enzymol* 343, 600-11 (2002).

Murga, C. et al. High affinity binding of beta-adrenergic receptor kinase to microsomal membranes. Modulation of the activity of bound kinase by heterotrimeric G protein activation. *J Biol Chem* 271, 985-94 (1996).

Nakamura, S., Roth, J. A. & Mukhopadhyay, T. Multiple lysine mutations in the C-terminal domain of p53 interfere with MDM2-dependent protein degradation and ubiquitination. *Mol Cell Biol* 20, 9391-8 (2000).

Nakayama, K. I. & Nakayama, K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 369-81 (2006).

Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A. & Chandu, D. The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci* 31, 137-55 (2006).

Neuhaus, E. M., Mashukova, A., Barbour, J., Wolters, D. & Hatt, H. Novel function of beta-arrestin2 in the nucleus of mature spermatozoa. *J Cell Sci* 119, 3047-56 (2006).

Nobles, K. N., Guan, Z., Xiao, K., Oas, T. G. & Lefkowitz, R. J. The active conformation of beta-arrestin1: direct evidence for the phosphate sensor in the N-domain and conformational differences in the active states of beta-arrestins1 and -2. *J Biol Chem* 282, 21370-81 (2007).

Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S. & Caron, M. G. Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem* 274, 32248-57 (1999).

Ogawara, Y. et al. Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *J Biol Chem* 277, 21843-50 (2002).

Okamoto, K. et al. DNA damage-induced phosphorylation of MdmX at serine 367 activates p53 by targeting MdmX for Mdm2-dependent degradation. *Mol Cell Biol* 25, 9608-20 (2005).

O'Keefe, K., Li, H. & Zhang, Y. Nucleocytoplasmic shuttling of p53 is essential for MDM2-mediated cytoplasmic degradation but not ubiquitination. *Mol Cell Biol* 23, 6396-405 (2003).

Oliner, J. D., Kinzler, K. W., Meltzer, P. S., George, D. L. & Vogelstein, B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in hu-



man sarcomas. *Nature* 358, 80-3 (1992).

Oren, M. et al. Regulation of p53: intricate loops and delicate balances. *Ann N Y Acad Sci* 973, 374-83 (2002).

Orsini, M. J. & Benovic, J. L. Characterization of dominant negative arrestins that inhibit beta2-adrenergic receptor internalization by distinct mechanisms. *J Biol Chem* 273, 34616-22 (1998).

Orsini, M. J. et al. MAPK superfamily activation in human airway smooth muscle: mitogenesis requires prolonged p42/p44 activation. *Am J Physiol* 277, L479-88 (1999).

Oyama, N. et al. Chronic beta-adrenergic receptor stimulation enhances the expression of G-Protein coupled receptor kinases, GRK2 and GRK5, in both the heart and peripheral lymphocytes. *Circ J* 69, 987-90 (2005).

**P**alczewski, K., Buczylo, J., Lebiada, L., Crabb, J. W. & Polans, A. S. Identification of the N-terminal region in rhodopsin kinase involved in its interaction with rhodopsin. *J Biol Chem* 268, 6004-13 (1993).

Pan, Y. & Chen, J. MDM2 promotes ubiquitination and degradation of MDMX. *Mol Cell Biol* 23, 5113-21 (2003).

Pao, C. S. & Benovic, J. L. Phosphorylation-independent desensitization of G protein-coupled receptors? *Sci STKE* 2002, PE42 (2002).

Parameswaran, N. et al. Arrestin-2 and G protein-coupled receptor kinase 5 interact with NFkappaB1 p105 and negatively regulate lipopolysaccharide-stimulated ERK1/2 activation in macrophages. *J Biol Chem* 281, 34159-70 (2006).

Pece, S. & Gutkind, J. S. E-cadherin and Hakai: signalling, remodeling or destruction? *Nat Cell Biol* 4, E72-4 (2002).

Penela, P., Elorza, A., Sarnago, S. & Mayor, F., Jr. Beta-arrestin- and c-Src-dependent degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *Embo J* 20, 5129-38 (2001).

Penela, P. et al. Mechanisms of regulation of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 69, 46-56 (2006).

Penela, P., Ribas, C. & Mayor, F., Jr. Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal* 15, 973-81 (2003).

Penela, P., Ruiz-Gomez, A., Castano, J. G. & Mayor, F., Jr. Degradation of the G protein-coupled receptor kinase 2 by the proteasome pa-

thway. *J Biol Chem* 273, 35238-44 (1998).

Penn, R. B., Pronin, A. N. & Benovic, J. L. Regulation of G protein-coupled receptor kinases. *Trends Cardiovasc Med* 10, 81-9 (2000).

Peregrin, S. et al. Phosphorylation of p38 by GRK2 at the docking groove unveils a novel mechanism for inactivating p38MAPK. *Curr Biol* 16, 2042-7 (2006).

Pfleger, C. M. & Kirschner, M. W. The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev* 14, 655-65 (2000).

Pi, M. et al. Beta-arrestin- and G protein receptor kinase-mediated calcium-sensing receptor desensitization. *Mol Endocrinol* 19, 1078-87 (2005).

Pickart, C. M. DNA repair: right on target with ubiquitin. *Nature* 419, 120-1 (2002).

Pickart, C. M. Back to the future with ubiquitin. *Cell* 116, 181-90 (2004).

Pickart, C. M. & Cohen, R. E. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 177-87 (2004).

Pickart, C. M. & Eddins, M. J. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1695, 55-72 (2004).

Pickart, C. M. & Fushman, D. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol* 8, 610-6 (2004).

Pierce, K. L., Maudsley, S., Daaka, Y., Luttrell, L. M. & Lefkowitz, R. J. Role of endocytosis in the activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade by sequestering and non-sequestering G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1489-94 (2000).

Pochampally, R., Fodera, B., Chen, L., Lu, W. & Chen, J. Activation of an MDM2-specific caspase by p53 in the absence of apoptosis. *J Biol Chem* 274, 15271-7 (1999).

Povsic, T. J., Kohout, T. A. & Lefkowitz, R. J. Beta-arrestin1 mediates insulin-like growth factor 1 (IGF-1) activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and anti-apoptosis. *J Biol Chem* 278, 51334-9 (2003).

Poyurovsky, M. V. et al. Nucleotide binding by the Mdm2 RING domain facilitates Arf-independent Mdm2 nucleolar localization. *Mol Cell* 12, 875-87 (2003).

Premont, R. T. et al. beta2-Adrenergic receptor regulation by GIT1, a G protein-coupled receptor kinase-associated ADP ribosylation fac-

tor GTPase-activating protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14082-7 (1998).

Premont, R. T. & Gainetdinov, R. R. Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol* 69, 511-34 (2007).

Premont, R. T. et al. The GRK4 subfamily of G protein-coupled receptor kinases. Alternative splicing, gene organization, and sequence conservation. *J Biol Chem* 274, 29381-9 (1999).

Premont, R. T. et al. Characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK4. Identification of four splice variants. *J Biol Chem* 271, 6403-10 (1996).

Press, M. F. et al. Her-2/neu expression in node-negative breast cancer: direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease. *Cancer Res* 53, 4960-70 (1993).

Pronin, A. N. & Benovic, J. L. Regulation of the G protein-coupled receptor kinase GRK5 by protein kinase C. *J Biol Chem* 272, 3806-12 (1997).

Pronin, A. N., Loudon, R. P. & Benovic, J. L. Characterization of G protein-coupled receptor kinases. *Methods Enzymol* 343, 547-59 (2002).

Pronin, A. N., Morris, A. J., Surguchov, A. & Benovic, J. L. Synucleins are a novel class of substrates for G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem* 275, 26515-22 (2000).

Pronin, A. N., Satpaev, D. K., Slepak, V. Z. & Benovic, J. L. Regulation of G protein-coupled receptor kinases by calmodulin and localization of the calmodulin binding domain. *J Biol Chem* 272, 18273-80 (1997).

Prowatke, I. et al. Expression analysis of imbalanced genes in prostate carcinoma using tissue microarrays. *Br J Cancer* 96, 82-8 (2007).

**R**amos-Ruiz, R., Penela, P., Penn, R. B. & Mayor, F., Jr. Analysis of the human G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) gene promoter: regulation by signal transduction systems in aortic smooth muscle cells. *Circulation* 101, 2083-9 (2000).

Rapacciuolo, A. et al. Protein kinase A and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation mediates beta-1 adrenergic receptor endocytosis through different pathways. *J Biol Chem* 278, 35403-11 (2003).

Rechsteiner, M. & Rogers, S. W. PEST se-

quences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21, 267-71 (1996).

Reed, S. H. & Gillette, T. G. Nucleotide excision repair and the ubiquitin proteasome pathway--do all roads lead to Rome? *DNA Repair (Amst)* 6, 149-56 (2007).

Ribas, C. et al. The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochim Biophys Acta* 1768, 913-22 (2007).

Rinaldo, C. et al. MDM2-regulated degradation of HIPK2 prevents p53Ser46 phosphorylation and DNA damage-induced apoptosis. *Mol Cell* 25, 739-50 (2007).

Rockman, H. A. et al. Expression of a beta-adrenergic receptor kinase 1 inhibitor prevents the development of myocardial failure in gene-targeted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7000-5 (1998).

Rodriguez, M. S., Desterro, J. M., Lain, S., Lane, D. P. & Hay, R. T. Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* 20, 8458-67 (2000).

Rossi, S. & Loda, M. The role of the ubiquitination-proteasome pathway in breast cancer: use of mouse models for analyzing ubiquitination processes. *Breast Cancer Res* 5, 16-22 (2003).

Rozengurt, E. Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J Cell Physiol* (2007).

Ruiz-Gomez, A. & Mayor, F., Jr. Beta-adrenergic receptor kinase (GRK2) colocalizes with beta-adrenergic receptors during agonist-induced receptor internalization. *J Biol Chem* 272, 9601-4 (1997).

Ruiz-Gomez, A. et al. G protein-coupled receptor kinase 2-mediated phosphorylation of downstream regulatory element antagonist modulator regulates membrane trafficking of Kv4.2 potassium channel. *J Biol Chem* 282, 1205-15 (2007).

**S**alcedo, A., Mayor, F., Jr. & Penela, P. Mdm2 is involved in the ubiquitination and degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *Embo J* 25, 4752-62 (2006).

Sallese, M. et al. Regulation of G protein-coupled receptor kinase subtypes by calcium sensor proteins. *Biochim Biophys Acta* 1498, 112-21 (2000).

Sallese, M., Mariggio, S., D'Urbano, E., Iacovelli, L. & De Blasi, A. Selective regulation

of Gq signaling by G protein-coupled receptor kinase 2: direct interaction of kinase N terminus with activated galphaq. *Mol Pharmacol* 57, 826-31 (2000).

Sanchez-Laorden, B. L., Jimenez-Cervantes, C. & Garcia-Borrón, J. C. Regulation of human melanocortin 1 receptor signaling and trafficking by Thr-308 and Ser-316 and its alteration in variant alleles associated with red hair and skin cancer. *J Biol Chem* 282, 3241-51 (2007).

Sanchez-Mas, J., Guillo, L. A., Zanna, P., Jimenez-Cervantes, C. & Garcia-Borrón, J. C. Role of G protein-coupled receptor kinases in the homologous desensitization of the human and mouse melanocortin 1 receptors. *Mol Endocrinol* 19, 1035-48 (2005).

Sanchez-Perez, A., Kumar, S. & Cook, D. I. GRK2 interacts with and phosphorylates Nedd4 and Nedd4-2. *Biochem Biophys Res Commun* 359, 611-5 (2007).

Santini, F., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Benovic, J. L. & Keen, J. H. Selective recruitment of arrestin-3 to clathrin coated pits upon stimulation of G protein-coupled receptors. *J Cell Sci* 113 (Pt 13), 2463-70 (2000).

Sarnago, S., Elorza, A. & Mayor, F., Jr. Agonist-dependent phosphorylation of the G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) by Src tyrosine kinase. *J Biol Chem* 274, 34411-6 (1999).

Schon, O., Friedler, A., Bycroft, M., Freund, S. M. & Fersht, A. R. Molecular mechanism of the interaction between MDM2 and p53. *J Mol Biol* 323, 491-501 (2002).

Schon, O., Friedler, A., Freund, S. & Fersht, A. R. Binding of p53-derived ligands to MDM2 induces a variety of long range conformational changes. *J Mol Biol* 336, 197-202 (2004).

Scott, M. G. et al. Differential nucleocytoplasmic shuttling of beta-arrestins. Characterization of a leucine-rich nuclear export signal in beta-arrestin2. *J Biol Chem* 277, 37693-701 (2002).

Secchiero, P. et al. Antiangiogenic activity of the MDM2 antagonist nutlin-3. *Circ Res* 100, 61-9 (2007).

Selvendiran, K. et al. EF24 induces G2/M arrest and apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells by increasing PTEN expression. *J Biol Chem* (2007).

Shanklin, J., Jabben, M. & Vierstra, R. D. Red light-induced formation of ubiquitin-phytochrome conjugates: Identification of possible intermediates of phytochrome degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 359-363 (1987).

Shenoy, S. K. Seven-transmembrane receptors and ubiquitination. *Circ Res* 100, 1142-54 (2007).

Shenoy, S. K. et al. Ubiquitination of beta-Arrestin Links Seven-transmembrane Receptor Endocytosis and ERK Activation. *J Biol Chem* 282, 29549-62 (2007).

Shenoy, S. K. et al. beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J Biol Chem* 281, 1261-73 (2006).

Shenoy, S. K. & Lefkowitz, R. J. Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *J Biol Chem* 278, 14498-506 (2003).

Shenoy, S. K. & Lefkowitz, R. J. Receptor regulation: beta-arrestin moves up a notch. *Nat Cell Biol* 7, 1159-61 (2005).

Shenoy, S. K. & Lefkowitz, R. J. Angiotensin II-stimulated signaling through G proteins and beta-arrestin. *Sci STKE* 2005, cm14 (2005).

Shenoy, S. K. & Lefkowitz, R. J. Seven-transmembrane receptor signaling through beta-arrestin. *Sci STKE* 2005, cm10 (2005).

Shenoy, S. K. & Lefkowitz, R. J. Receptor-specific ubiquitination of beta-arrestin directs assembly and targeting of seven-transmembrane receptor signalosomes. *J Biol Chem* 280, 15315-24 (2005).

Shenoy, S. K., McDonald, P. H., Kohout, T. A. & Lefkowitz, R. J. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science* 294, 1307-13 (2001).

Shinozaki, T., Nota, A., Taya, Y. & Okamoto, K. Functional role of Mdm2 phosphorylation by ATR in attenuation of p53 nuclear export. *Oncogene* 22, 8870-80 (2003).

Shmueli, A. & Oren, M. Mdm2: p53's lifesaver? *Mol Cell* 25, 794-6 (2007).

Shui, Z., Khan, I. A., Haga, T., Benovic, J. L. & Boyett, M. R. Control of the cardiac muscarinic K<sup>+</sup> channel by beta-arrestin 2. *J Biol Chem* 276, 11691-7 (2001).

Sikder, D., Johnston, S. A. & Kodadek, T. Widespread, but non-identical, association of proteasomal 19 and 20 S proteins with yeast chromatin. *J Biol Chem* 281, 27346-55 (2006).

Slamon, D. J. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235,



177-82 (1987).

Smith, N. J. & Luttrell, L. M. Signal switching, crosstalk, and arrestin scaffolds: novel G protein-coupled receptor signaling in cardiovascular disease. *Hypertension* 48, 173-9 (2006).

Song, X., Gurevich, E. V. & Gurevich, V. V. Cone arrestin binding to JNK3 and Mdm2: conformational preference and localization of interaction sites. *J Neurochem* (2007).

Song, X., Raman, D., Gurevich, E. V., Vishnivetskiy, S. A. & Gurevich, V. V. Visual and both non-visual arrestins in their "inactive" conformation bind JNK3 and Mdm2 and relocalize them from the nucleus to the cytoplasm. *J Biol Chem* 281, 21491-9 (2006).

Sorkin, A. Ubiquitination without E3. *Mol Cell* 26, 771-3 (2007).

Spence, J. et al. Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell* 102, 67-76 (2000).

Sterne-Marr, R. et al. G protein-coupled receptor Kinase 2/G alpha q/11 interaction. A novel surface on a regulator of G protein signaling homology domain for binding G alpha subunits. *J Biol Chem* 278, 6050-8 (2003).

Stevenson, L. F. et al. The deubiquitinating enzyme USP2a regulates the p53 pathway by targeting Mdm2. *Embo J* 26, 976-86 (2007).

Strous, G. J. & Schantl, J. A. Beta-arrestin and Mdm2, unsuspected partners in signaling from the cell surface. *Sci STKE* 2001, PE41 (2001).

Sun, L. & Chen, Z. J. The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr Opin Cell Biol* 16, 119-26 (2004).

Sun, Y. Targeting E3 ubiquitin ligases for cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 2, 623-9 (2003).

**T**aranto, E. et al. Detection of the p53 regulator murine double-minute protein 2 in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 32, 424-9 (2005).

Tiruppathi, C. et al. G protein-coupled receptor kinase-5 regulates thrombin-activated signaling in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7440-5 (2000).

Tohgo, A. et al. The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J Biol Chem* 278, 6258-67 (2003).

Tohgo, A., Pierce, K. L., Choy, E. W., Lefkowitz, R. J. & Luttrell, L. M. beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *J Biol Chem* 277, 9429-36 (2002).

Toledo, F. & Wahl, G. M. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* 6, 909-23 (2006).

Toth, A., Nickson, P., Qin, L. L. & Erhardt, P. Differential regulation of cardiomyocyte survival and hypertrophy by MDM2, an E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 281, 3679-89 (2006).

**U**chida, C. et al. Enhanced Mdm2 activity inhibits pRB function via ubiquitin-dependent degradation. *Embo J* 24, 160-9 (2005).

Ulrich, H. D. Degradation or maintenance: actions of the ubiquitin system on eukaryotic chromatin. *Eukaryot Cell* 1, 1-10 (2002).

Usui, I. et al. G protein-coupled receptor kinase 2 mediates endothelin-1-induced insulin resistance via the inhibition of both Galphaq/11 and insulin receptor substrate-1 pathways in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 19, 2760-8 (2005).

Usui, I. et al. beta-arrestin-1 competitively inhibits insulin-induced ubiquitination and degradation of insulin receptor substrate 1. *Mol Cell Biol* 24, 8929-37 (2004).

**V**anhaesebroeck, B. & Alessi, D. R. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 346 Pt 3, 561-76 (2000).

Varadan, R. et al. Solution conformation of Lys63-linked di-ubiquitin chain provides clues to functional diversity of polyubiquitin signaling. *J Biol Chem* 279, 7055-63 (2004).

Varshavsky, A. The N-end rule. *Cell* 69, 725-35 (1992).

Vasilcanu, R. et al. Picropodophyllin induces downregulation of the insulin-like growth factor 1 receptor: potential mechanistic involvement of Mdm2 and beta-arrestin1. *Oncogene* (2007).

Violin, J. D., Ren, X. R. & Lefkowitz, R. J. G-protein-coupled receptor kinase specificity for beta-arrestin recruitment to the beta2-adrenergic receptor revealed by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 281, 20577-88 (2006).

Vishnivetskiy, S. A., Hosey, M. M., Benovic, J. L. & Gurevich, V. V. Mapping the arrestin-receptor interface. Structural elements responsi-

ble for receptor specificity of arrestin proteins. *J Biol Chem* 279, 1262-8 (2004).

Voges, D., Zwickl, P. & Baumeister, W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 68, 1015-68 (1999).

Vroon, A., Heijnen, C. J. & Kavelaars, A. GRKs and arrestins: regulators of migration and inflammation. *J Leukoc Biol* 80, 1214-21 (2006).

Wakefield, L. M. & Roberts, A. B. TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev* 12, 22-9 (2002).

**W**ang, G., Moniri, N. H., Ozawa, K., Stamler, J. S. & Daaka, Y. Nitric oxide regulates endocytosis by S-nitrosylation of dynamin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1295-300 (2006).

Wang, J. & Maldonado, M. A. The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol* 3, 255-61 (2006).

Wang, M. & Pickart, C. M. Different HECT domain ubiquitin ligases employ distinct mechanisms of polyubiquitin chain synthesis. *Embo J* 24, 4324-33 (2005).

Wang, P. et al. Beta-arrestin 2 functions as a G-protein-coupled receptor-activated regulator of oncoprotein Mdm2. *J Biol Chem* 278, 6363-70 (2003).

Wang, P., Wu, Y., Ge, X., Ma, L. & Pei, G. Subcellular localization of beta-arrestins is determined by their intact N domain and the nuclear export signal at the C terminus. *J Biol Chem* 278, 11648-53 (2003).

Wang, X. et al. NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN. *Cell* 128, 129-39 (2007).

Weber, H. O. et al. HDM2 phosphorylation by MAPKAP kinase 2. *Oncogene* 24, 1965-72 (2005).

Wei, H. et al. Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10782-7 (2003).

Weissman, A. M. Regulating protein degradation by ubiquitination. *Immunol Today* 18, 189-98 (1997).

Whalen, E. J. et al. Regulation of beta-adrenergic receptor signaling by S-nitrosylation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *Cell* 129, 511-22 (2007).

Willems, J. M., Challiss, R. A. & Nahorski, S. R. Non-visual GRKs: are we seeing the whole picture? *Trends Pharmacol Sci* 24, 626-33 (2003).

Willems, J. M., Parent, J. L., Benovic, J. L. & Kelly, E. Selective reduction in A2 adenosine receptor desensitization following antisense-induced suppression of G protein-coupled receptor kinase 2 expression. *J Neurochem* 73, 1781-9 (1999).

Wolfe, B. L., Marchese, A. & Trejo, J. Ubiquitination differentially regulates clathrin-dependent internalization of protease-activated receptor-1. *J Cell Biol* 177, 905-16 (2007).

Wolfe, B. L. & Trejo, J. Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis. *Traffic* 8, 462-70 (2007).

Wu, G., Benovic, J. L., Hildebrandt, J. D. & Lanier, S. M. Receptor docking sites for G-protein betagamma subunits. Implications for signal regulation. *J Biol Chem* 273, 7197-200 (1998).

Wu, J. H. et al. The platelet-derived growth factor receptor-beta phosphorylates and activates G protein-coupled receptor kinase-2. A mechanism for feedback inhibition. *J Biol Chem* 280, 31027-35 (2005).

Wu, P. Y. et al. A conserved catalytic residue in the ubiquitin-conjugating enzyme family. *Embo J* 22, 5241-50 (2003).

**X**iao, K., Shenoy, S. K., Nobles, K. & Lefkowitz, R. J. Activation-dependent conformational changes in {beta}-arrestin 2. *J Biol Chem* 279, 55744-53 (2004).

Xiong, L., Kou, F., Yang, Y. & Wu, J. A novel role for IGF-1R in p53-mediated apoptosis through translational modulation of the p53-Mdm2 feedback loop. *J Cell Biol* 178, 995-1007 (2007).

Xirodimas, D., Saville, M. K., Edling, C., Lane, D. P. & Lain, S. Different effects of p14ARF on the levels of ubiquitinated p53 and Mdm2 in vivo. *Oncogene* 20, 4972-83 (2001).

Xirodimas, D. P., Saville, M. K., Bourdon, J. C., Hay, R. T. & Lane, D. P. Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity. *Cell* 118, 83-97 (2004).

**Y**ang, J. Y. et al. MDM2 promotes cell motility and invasiveness by regulating E-cadherin degradation. *Mol Cell Biol* 26, 7269-82 (2006).

Yang, Y., Li, C. C. & Weissman, A. M. Regulating the p53 system through ubiquitination. *Oncogene* 23, 2096-106 (2004).

Yang, Y., Lorick, K. L., Jensen, J. P. & Weiss-



sman, A. M. Expression and evaluation of RING finger proteins. *Methods Enzymol* 398, 103-12 (2005).

Yoeli-Lerner, M. et al. Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. *Mol Cell* 20, 539-50 (2005).

Young, K. W. et al. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent translocation of sphingosine kinase: role in plasma membrane relocation but not activation. *Cell Calcium* 33, 119-28 (2003).

Zeng, S. X., Jin, Y., Kuning, D. T., Rotwein, P. & Lu, H. The acetylase activity of p300 is dispensable for MDM2 stabilization. *J Biol Chem* 278, 7453-8 (2003).

Zhang, M., Pickart, C. M. & Coffino, P. Determinants of proteasome recognition of ornithine decarboxylase, a ubiquitin-independent substrate. *Embo J* 22, 1488-96 (2003).

Zhao, B. X. et al. p53 mediates the negative regulation of MDM2 by orphan receptor TR3. *Embo J* 25, 5703-15 (2006).

Zhao, J., Pei, G., Huang, Y. L., Zhong, F. M. & Ma, L. Carboxyl terminus of delta opioid receptor is required for agonist-dependent receptor phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 238, 71-6 (1997).

Zheng, H., Loh, H. H. & Law, P. Y. {beta}-Arrestin-dependent {micro}-opioid receptor-activated ERKs translocate to nucleus in contrast to G protein-dependent ERKs activation. *Mol Pharmacol* (2007).

Zhou, B. P. & Hung, M. C. Novel targets of Akt, p21(Cip1/WAF1), and MDM2. *Semin Oncol* 29, 62-70 (2002).

Zhou, B. P. et al. HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol* 3, 973-82 (2001).





# Mdm2 is involved in the ubiquitination and degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2

Alicia Salcedo, Federico Mayor Jr\* and Petronila Penela\*

Departamento de Biología Molecular and Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa', Consejo Superior de Investigaciones Científicas- Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

**G-protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) is a central regulator of G-protein-coupled receptor signaling. We report that Mdm2, an E3-ubiquitin ligase involved in the control of cell growth and apoptosis, plays a key role in GRK2 degradation. Mdm2 and GRK2 association is enhanced by  $\beta_2$ -adrenergic receptor stimulation and  $\beta$ -arrestin. Increased Mdm2 expression accelerates GRK2 proteolysis and promotes kinase ubiquitination at defined residues, whereas GRK2 turnover is markedly impaired in Mdm2-deficient cells. Moreover, we find that activation of the PI3K/Akt pathway by insulin-like growth factor-1 alters Mdm2-mediated GRK2 degradation, leading to enhanced GRK2 stability and increased kinase levels. These data put forward a novel mechanism for controlling GRK2 expression in physiological and pathological conditions.**

*The EMBO Journal* advance online publication, 28 September 2006; doi:10.1038/sj.emboj.7601351

**Subject Categories:** signal transduction

**Keywords:** degradation; GRK2; IGF-1; Mdm2

## Introduction

G-protein-coupled receptor kinases (GRKs) and  $\beta$ -arrestins are critical regulators of a wide variety of biological processes. First, these proteins play a major role in the attenuation of signaling mediated by the large family of G-protein-coupled receptors (GPCRs) (Gainetdinov *et al*, 2004). Besides promoting activation of heterotrimeric G proteins, agonist stimulation of GPCRs leads to receptor phosphorylation by GRKs (Kohout and Lefkowitz, 2003; Penela *et al*, 2003). This phosphorylation event facilitates binding of  $\beta$ -arrestins to the receptor, resulting in uncoupling from G proteins. Acting as adaptor proteins for components of the endocytic machinery, arrestins also trigger receptor internalization. Therefore, GRKs and arrestins are involved in GPCR desensitization, endocytosis and resensitization (Ferguson, 2001).

$\beta$ -Arrestins and GRKs also regulate other membrane receptor families. It has been reported that  $\beta$ -arrestin binds to ligand-stimulated insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1-

R), thereby promoting receptor internalization and enhancing IGF-dependent mitogenic signaling (Lin *et al*, 1998). GRK2, a ubiquitously expressed member of the GRK family, also phosphorylates PDGF-R $\beta$  and reduces receptor activity without altering its downregulation (Freedman *et al*, 2002; Hildreth *et al*, 2004). In addition,  $\beta$ -arrestins can act as scaffold molecules that bring different signaling molecules into the receptor complex (reviewed by Lefkowitz and Shenoy, 2005). Likewise, GRK2 has been shown to phosphorylate non-receptor substrates and also to interact with a variety of signaling proteins such as PI3K $\gamma$ , G $\alpha_q$  or GIT (Penela *et al*, 2003, 2006, and references therein). GRK2 also inhibits TGF- $\beta$ -mediated cell growth arrest and apoptosis by inducing Smad phosphorylation (Ho *et al*, 2005). Overall, these data suggest that GRK2 may have 'effector' functions beyond receptor desensitization.

Such functional complexity predicts that alterations in GRK2 levels and/or activity may have important effects on cell signaling. Interestingly, several pathological conditions such as congestive heart failure, hypertension and rheumatoid arthritis (RA), among others, display altered GRK2 expression and function (reviewed by Penela *et al*, 2003, 2006; Metaye *et al*, 2005). Whereas different regulatory mechanisms of GRK2 activity and subcellular localization have been described (reviewed by Kohout and Lefkowitz, 2003; Penela *et al*, 2003), the mechanisms that govern GRK2 cellular levels have only recently begun to be addressed. We first described that GRK2 is rapidly degraded by the proteasome pathway, and that  $\beta_2$ -adrenergic receptor ( $\beta_2$ AR) activation enhances GRK2 ubiquitination and turnover (Penela *et al*, 1998). We have also shown that agonist-dependent binding of  $\beta$ -arrestin to GPCRs supports GRK2 degradation by allowing the recruitment of c-Src and the phosphorylation of GRK2 on critical tyrosine residues (Penela *et al*, 2001). MAPK-mediated GRK2 phosphorylation also triggers GRK2 degradation in a process that is again dependent on  $\beta$ -arrestin function (Elorza *et al*, 2003).

Proteasome degradation requires the orchestrated activities of the ubiquitin-activating enzyme (E1), ubiquitin-conjugating enzymes (E2) and ubiquitin ligases (E3) (Pickart, 2001). The specificity of target protein selection is determined by ubiquitin ligases, which interact with their substrates either directly or by means of adaptor molecules. Interestingly,  $\beta$ -arrestins are able to interact with Mdm2, a RING domain-containing E3-ubiquitin ligase involved in the control of tumor suppressor p53 activity (Weissman, 2001).  $\beta$ -Arrestin-mediated recruitment of Mdm2 to several GPCR complexes leads to different  $\beta$ -arrestin ubiquitination patterns, which controls the characteristics of MAPK activation and receptor internalization (Shenoy *et al*, 2001; Shenoy and Lefkowitz, 2003, 2005; Wang *et al*, 2003).

In this report, we identify Mdm2 as an E3-ubiquitin ligase for GRK2 that is critically involved in kinase ubiquitination and degradation. Moreover, we put forward a new Mdm2-mediated pathway for the modulation of GRK2 cellular levels

\*Corresponding authors. F Mayor or P Penela, Departamento de Biología Molecular and Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa', Consejo Superior de Investigaciones Científicas- Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 497 4865; Fax: +34 91 497 4799; E-mails: fmayor@cbm.uam.es or ppenela@cbm.uam.es

Received: 20 March 2006; accepted: 23 August 2006

by IGF-1. Control of GRK2 protein levels by Mdm2 may represent a versatile mechanism for fine-tuning of the expression of this key regulatory kinase by different extracellular signals.

## Results

### *Mdm2 associates with GRK2 and this process is facilitated by $\beta_2$ AR stimulation and $\beta$ -arrestin*

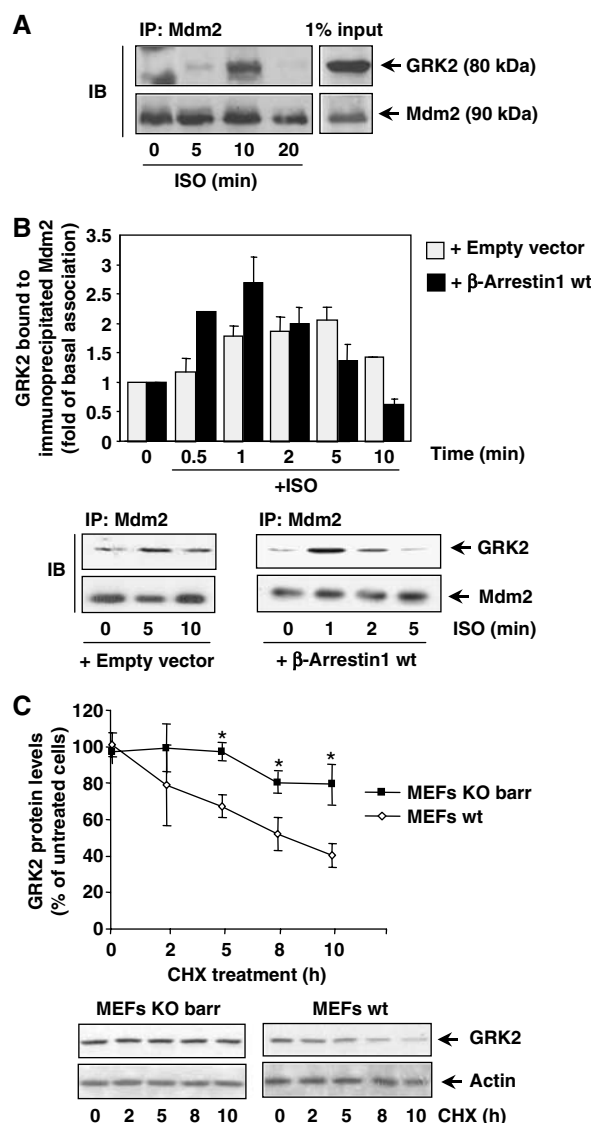
GRK2 is rapidly degraded by the proteasome pathway in response to  $\beta_2$ AR agonist stimulation, whereas the turnover of the GRK2-K220R mutant, which lacks kinase activity, is severely impaired (Penela *et al*, 1998). We have also reported that GRK2 turnover is dependent on  $\beta$ -arrestin function, and that overexpression of either  $\beta$ -arrestin1 or  $\beta$ -arrestin2 is able to promote GRK2-K220R proteolysis (Penela *et al*, 2001), thus suggesting that these adaptor molecules may recruit some of the factors needed for GRK2 ubiquitination and proteasome degradation. Interestingly,  $\beta$ -arrestins interact with Mdm2, bringing this protein to the plasma membrane  $\beta_2$ AR complex, where Mdm2 triggers ubiquitination of  $\beta$ -arrestins and also auto-ubiquitination (Shenoy *et al*, 2001; Wang *et al*, 2003). As GRK2 is also part of activated GPCR complexes, we explored the possibility that Mdm2 could act as a GRK2 ubiquitin ligase. Consistent with this idea, we find that endogenous GRK2 and Mdm2 can associate in MCF7 cells, as shown by co-immunoprecipitation experiments using either anti-GRK2 or anti-Mdm2 antibodies (Supplementary data and Supplementary Figure S1A). This suggests that both proteins can be found in the same molecular complex at steady-state conditions 'in situ'.

We have previously shown that agonist stimulation of  $\beta_2$ AR decreases GRK2 half-life from 60 min (basal conditions) to ~30 min (stimulated turnover) (Penela *et al*, 1998). Therefore, we tested whether Mdm2 association to GRK2 would be modified by receptor activation. Figure 1A and B shows that  $\beta_2$ AR stimulation promotes a rapid and transient increase in endogenous GRK2/Mdm2 association in HeLa cells and in HEK-293 cells coexpressing these proteins. It is worth noting that  $\beta_2$ AR stimulation also triggers a rapid and transient association of  $\beta$ -arrestins with Mdm2 (Wang *et al*, 2003). Interestingly, we find that overexpression of  $\beta$ -arrestin1 increases both the extent and kinetics (maximal co-immunoprecipitation detected at 1–2 min) of GRK2/Mdm2 association upon  $\beta$ -agonist challenge (Figure 1B). A similar effect was observed upon expression of  $\beta$ -arrestin2 (data not shown). Consistent with a key mediator role for arrestins in GRK2 turnover, we find that protein decay of endogenous GRK2 (as assessed by chase experiments in the presence of cycloheximide) was severely delayed in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) lacking both  $\beta$ -arrestin1 and  $\beta$ -arrestin2 compared to wild-type MEFs (Figure 1C), indicating that expression of  $\beta$ -arrestins is necessary for normal GRK2 degradation in physiological conditions.

Taken together, these results indicate that Mdm2 can interact with GRK2 in an agonist-dependent manner and suggest that  $\beta$ -arrestin could be a pivotal adaptor to position Mdm2 and/or other ligases in the vicinity of GRK2.

### *Mdm2 promotes GRK2 degradation*

We next investigated whether Mdm2 could increase the turnover rate of GRK2. First, the stability of GRK2 was



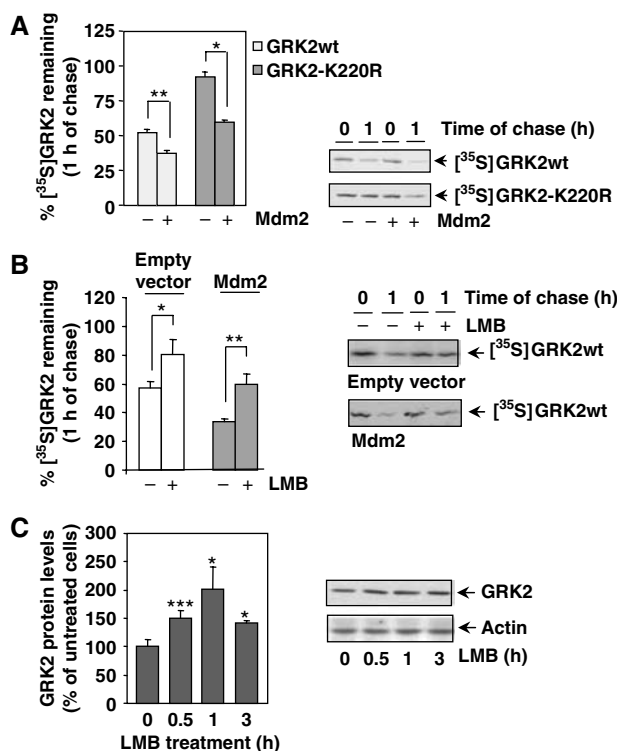
**Figure 1** (A) Association of endogenous Mdm2 and GRK2. HeLa cells growing in 150 mm dishes were serum-starved for 2 h and incubated with an inverse  $\beta$ -agonist (betaxolol, 10  $\mu$ M) for 15 min to lessen basal Mdm2/GRK2 association before challenging with 10  $\mu$ M isoproterenol for the indicated times. Cells were lysed in buffer A as detailed in Materials and methods and lysates subjected to immunoprecipitation with anti-Mdm2 (SMP14) antibody. Immunoprecipitates were resolved by SDS-PAGE and GRK2 associated to the Mdm2 immunocomplex was detected by Western blot analysis with a specific antibody. 1% of the total lysate used for immunoprecipitation was loaded as input signal. (B) The Mdm2/GRK2 association is enhanced by  $\beta_2$ AR stimulation and  $\beta$ -arrestin expression. HEK-293 cells were transiently transfected with plasmids encoding GRK2,  $\beta_2$ AR, Mdm2 and  $\beta$ -arrestin1 when indicated. Cells were challenged with 10  $\mu$ M isoproterenol for different times and GRK2/Mdm2 co-immunoprecipitation assessed as detailed in Materials and methods. GRK2 presence in the non-stimulated Mdm2 immunocomplex was taken as the control condition. Data were normalized by total Mdm2 and depicted as mean  $\pm$  s.e.m. of four independent experiments. A representative gel is shown in the bottom panel. (C) Normal decay of GRK2 protein is impaired upon of  $\beta$ -arrestin1 and  $\beta$ -arrestin2 knockdown. GRK2 protein levels were examined by immunoblot analysis in both wild-type and  $\beta$ -arrestin1/2-deficient MEFs upon treatment with cycloheximide (CHX) for the indicated times. The amount of GRK2 at 0 h was defined as 100%, and data normalized by actin protein levels. In both panels, data are the mean  $\pm$  s.e.m. of four independent experiments (\* $P$  < 0.05). Representative gels are shown.



determined by pulse-chase assays in HEK-293 cells transiently coexpressing Mdm2 or an empty vector. As shown in Figure 2A, the levels of GRK2 protein decline more rapidly in the presence of Mdm2 ( $37 \pm 1\%$  of [ $^{35}\text{S}$ ]GRK2 protein remaining at 1 h of chase versus  $56 \pm 3\%$  in the absence of Mdm2 overexpression). Such Mdm2-induced GRK2 proteolysis is blocked by the proteasome inhibitor MG132 (Supplementary data and Supplementary Figure S1B). We have previously shown that the kinase-dead mutant GRK2-K220R displays a severely impaired degradation, probably as a consequence of reduced  $\beta$ -arrestin recruitment to the receptor complex (Penela *et al*, 2001). Interestingly, Mdm2 is able to associate with this mutant to an extent similar to the wild-type kinase (Supplementary data and Supplementary Figure S1C) and to rescue its defective turnover (Figure 2A,  $60 \pm 1\%$  of GRK2-K220R remaining at 1 h of chase compared

to  $92 \pm 5\%$  in the absence of Mdm2 expression). Overall, these data are consistent with a role for Mdm2 in the agonist-induced,  $\beta$ -arrestin-mediated GRK2 degradation.

We next analyzed the effect of leptomycin B (LMB) on GRK2 stability. LMB, a drug that blocks nuclear export, has been shown to inhibit Mdm2 nuclear-cytoplasmic shuttling, thus leading to an increased nuclear localization of Mdm2 (Lain *et al*, 1999). As shown in Figure 2B, the turnover of transiently transfected GRK2 in HEK-293 is significantly retarded in the presence of LMB ( $80 \pm 10\%$  of protein remaining at 1 h of chase compared with  $57 \pm 5\%$  in control conditions). This treatment does not affect GRK2 localization in our experimental conditions (data not shown), thereby ruling out that this effect is caused by altered kinase distribution. Moreover, the enhanced GRK2 turnover observed upon co-expression of Mdm2 ( $34 \pm 2\%$  of labeled kinase remaining) was not observed in the presence of LMB ( $60 \pm 6\%$  of protein remaining), thus suggesting that the effects of LMB on GRK2 stability are due to the impairment of Mdm2 function and/or localization. In line with this notion, LMB promotes a time-dependent increase (in the range of  $\approx 1.4$ - to 2-fold) of endogenous GRK2 steady-state levels in MCF7 cells (Figure 2C), consistent with a physiological role for Mdm2 in GRK2 degradation.



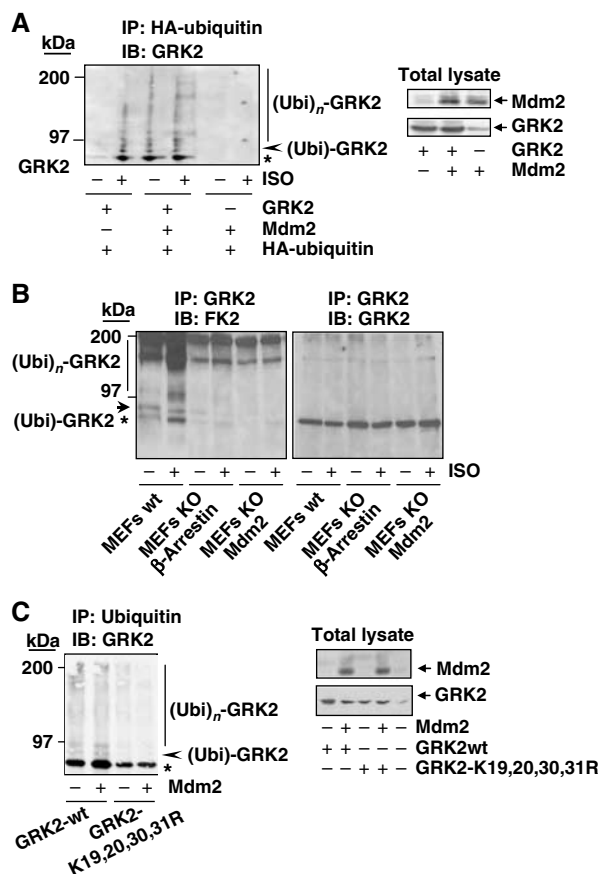
**Figure 2** (A) Mdm2 increases degradation of GRK2 and of a slow-turnover GRK2 mutant. HEK-293 cells were transiently transfected with wild-type GRK2 or the GRK2-K220R mutant in the presence or absence of Mdm2, and kinase turnover assessed by pulse-chase experiments as described in Materials and methods.  $^{35}\text{S}$ -labeled proteins immunoprecipitated with the anti-GRK2 antibody AbFP2 were resolved by SDS-PAGE followed by fluorography and densitometry.  $^{35}\text{S}$ -labeled GRK2 band densities were then normalized to total GRK2 present in the immunoprecipitates, as determined by Western blot analysis. Data are mean  $\pm$  s.e.m. of 3–4 independent experiments performed in duplicate,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ . A representative gel autoradiography is shown. (B, C) Effect of LMB treatment on GRK2 turnover. HEK-293 cells transfected with GRK2 and Mdm2 or an empty vector were treated with LMB or vehicle before and during pulse-chase experiments as detailed in Materials and methods, and GRK2 turnover determined as in previous figures. Data are the mean  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments performed in duplicate,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ . Representative fluorographs are shown. In panel C, endogenous GRK2 expression levels were determined by immunoblot analysis in lysates from MCF7 cells treated for different times with LMB. Data are corrected for actin expression and depicted as percentage of control.  $*P < 0.05$ ,  $***P < 0.001$ . A representative blot is shown.

### Mdm2 modulates GRK2 ubiquitination

We have previously reported that agonist stimulation of  $\beta_2\text{AR}$  promotes an increase in GRK2 polyubiquitination, consistent with its stimulatory effect on kinase turnover (Penela *et al*, 1998). As  $\beta_2\text{AR}$  activation triggers Mdm2/GRK2 association, we next investigated whether Mdm2 would modulate GRK2 ubiquitination. HEK-293 cells were transiently transfected with  $\beta_2\text{AR}$ , HA-tagged ubiquitin and GRK2 in the presence or absence of Mdm2. Interestingly, both basal and agonist-induced GRK2 polyubiquitination are markedly enhanced upon Mdm2 expression (Figure 3A), supporting a role for Mdm2 as an E3-ubiquitin ligase for GRK2.

The GRK2 ubiquitination patterns induced by receptor stimulation or Mdm2 expression are very similar. The bands of modified kinase migrating at 80 kDa (asterisk) and immediately above (arrowhead) appear to correspond to monoubiquitinated forms of GRK2, whereas the smeared bands in the 97–200 kDa range correspond to polyubiquitinated species of GRK2 (see Supplementary data and Supplementary Figure S2A).

To further substantiate the involvement of Mdm2 as a GRK2 ubiquitin ligase, we compared the ubiquitination of endogenous kinase in wild-type MEFs (expressing endogenous Mdm2 levels) or in MEFs from Mdm2-deficient mice. As shown in Figure 3B, in wild-type MEFs, isoproterenol challenge promotes a marked increase in endogenous GRK2 ubiquitinated species. It must be noted that such basal and agonist-promoted GRK2 ubiquitination pattern is similar to that observed in a heterologous system with overexpressed proteins (see Figure 3A). Interestingly, in Mdm2-deficient MEFs, basal GRK2 ubiquitination was attenuated, whereas the agonist-induced component was severely inhibited, indicating a pivotal role for Mdm2 in this process. Moreover, a similar impairment of GRK2 ubiquitination results also from the absence of  $\beta$ -arrestins, consistent with their role as mediators of the ligase recruitment to GRK2 (Figure 3B).



**Figure 3** Mdm2 promotes GRK2 ubiquitination. (A) Wild-type GRK2, HA-ubiquitin and  $\beta_2$ AR expression plasmids were transfected together with Mdm2 or an empty vector into HEK-293 cells. After 2 h of serum starving, cells were incubated with or without 10  $\mu$ M isoproterenol for 15 min and lysed for ubiquitination assays as described in Materials and methods. The different GRK2 species present in the ubiquitin immunoprecipitates are indicated. Asterisk and arrowhead indicate mono- and bi-ubiquitinated GRK2 forms (see text for details). Blots depicting expression levels for Mdm2 and GRK2 in total lysates are shown. (B) Both basal and agonist-stimulated ubiquitination of endogenous GRK2 are blocked in either Mdm2- or  $\beta$ -arrestin-deficient cells.  $\sim 50 \times 10^6$  wild-type MEFs or MEFs devoid of Mdm2 or  $\beta$ -arrestin proteins were serum-starved and challenged or not with 10  $\mu$ M isoproterenol for 15 min. Cells were processed as indicated above and ubiquitinated GRK2 species were analyzed by immunoprecipitation of endogenous GRK2 with a specific monoclonal anti-GRK2 antibody (c5/1.1) and detection of endogenous ubiquitin conjugates with anti-ubiquitin antibody FK2. Membranes were stripped and immunoblotted (right panel) with a specific polyclonal anti-GRK2 antibody (C-15) to confirm equal GRK2 loading in each condition. (C) Mutation of critical lysine residues in the N-terminus of GRK2 impairs kinase ubiquitination in the presence of Mdm2. Wild-type GRK2 or the GRK2-K19,20,30,31R mutant was cotransfected with ubiquitin plasmids in the presence or absence of Mdm2 into HEK-293 cells and the kinase ubiquitination pattern was analyzed as above. Expression levels of GRK2 and Mdm2 were assessed in lysates by Western blot analysis. Gels in all panels are representative of 2–3 independent experiments.

To explore the specificity of GRK2 ubiquitination by Mdm2, we sought to identify lysine residues in GRK2 critical for supporting Mdm2-dependent ubiquitin attachment. Multiple lysine-to-arginine changes in lysine-rich regions have been reported to result in resistance to proteasomal degradation in several proteins, including p53, the classical Mdm2 target (Rodriguez *et al*, 2000). As GRK2 lysine residues

at positions 19, 21, 30 and 31 are in close proximity to the initial cleavage site on GRK2 by the proteasome (Penela *et al*, 1998), we tested the ubiquitination and degradation pattern of a GRK2-K19,21,30,31R mutant transiently coexpressed in HEK-293 cells with the  $\beta_2$ AR and a tagged HA-ubiquitin construct. Mutation of these lysine residues leads to a clear reduction in the extent and pattern of ubiquitination as compared to wild-type GRK2, both in basal conditions and upon receptor challenge (Supplementary data and Supplementary Figure S2B). Moreover, in contrast to wild-type kinase, the presence of Mdm2 does not modify the extent of GRK2-K19,21,30,31R ubiquitination (Figure 3C), despite the fact that this mutant can associate with Mdm2, as demonstrated by co-immunoprecipitation experiments (Supplementary data and Supplementary Figure S3A). Overall, these results suggest that at least some of these lysine residues in GRK2 are targeted by Mdm2 in an agonist-dependent manner.

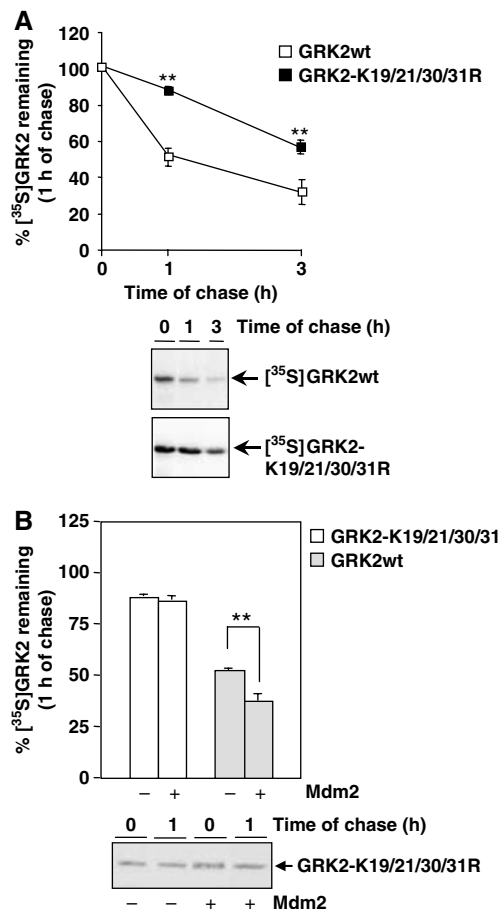
### Mdm2-mediated ubiquitination of GRK2 lysine residues 19, 21, 30 and 31 is critical for kinase degradation

We next investigated the consequences of impairing Mdm2-dependent ubiquitination of GRK2. The GRK2-K19,21,30,31R mutant was transiently coexpressed in HEK-293 cells with the  $\beta_2$ AR, and the kinase turnover was analyzed by pulse-chase assays. As shown in Figure 4A, degradation of this mutant was clearly delayed in basal conditions, with a half-life three-fold longer than that of wild-type GRK2, consistent with its reduced ubiquitination. Moreover, receptor stimulation does not significantly enhance GRK2-K19,21,30,31R degradation (data not shown). It should be noted that this mutant displayed similar subcellular distribution and kinase activity as compared to wild-type GRK2 (Supplementary data and Supplementary Figure S3B and C), thus ruling out the possibility that the altered degradation might arise from changes other than impaired ubiquitination. In this regard, the slower turnover of this mutant was also blocked in the presence of proteasome inhibitors (data not shown), thus confirming that mutation of these lysine residues severely retards but does not change the proteolytic pathway responsible for degrading the protein.

Interestingly, overexpression of Mdm2 is unable to accelerate GRK2-K19,21,30,31R degradation ( $88 \pm 3\%$  of mutant protein remaining in the absence of Mdm2 compared with  $86 \pm 4\%$  in its presence; Figure 4B). These results indicate that the ubiquitination of defined amino-terminal lysine residues of GRK2 is critical for proper kinase degradation and also strongly suggest that the agonist-dependent increase in GRK2 turnover involves the E3 ligase Mdm2-dependent modification of these residues.

### GRK2 turnover rate is markedly decreased by Mdm2 knockdown

In order to substantiate the regulatory role of Mdm2 in GRK2 stability, we next examined whether degradation of ectopically expressed GRK2 is altered in Mdm2-deficient MEFs. Figure 5A shows that the GRK2 protein decay is severely impaired in the absence of Mdm2, with  $98 \pm 9\%$  of labeled GRK2 remaining after 1 h of chase, which resembles the altered kinase degradation caused by abrogation of its Mdm2-dependent ubiquitination (Figure 4A and B). Interestingly, restoration of Mdm2 expression in the Mdm2-deficient MEFs

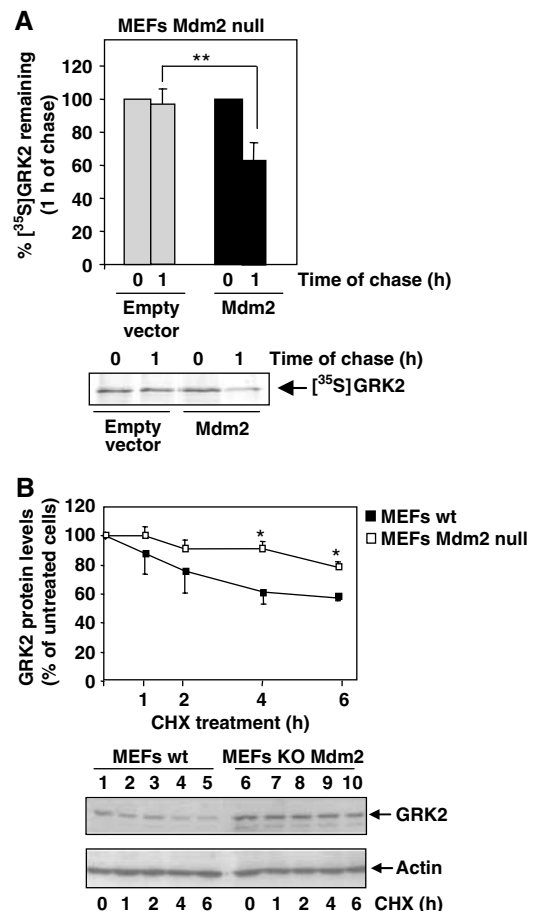


**Figure 4** N-terminal lysine residues are critical for Mdm2-mediated GRK2 degradation. (A) Turnover of wild-type GRK2 and GRK2-K19,20,30,31R mutant proteins was assessed by pulse-chase experiments in HEK-293 cells as described in Materials and methods and Figure 2. (B) Similar experiments were performed in cells cotransfected with an Mdm2 construct. In both panels, data are mean  $\pm$  s.e.m. from three to four independent experiments (\*\* $P < 0.01$ ), and representative fluorographies are shown.

rescues GRK2 turnover (Figure 5A), leading to a proteolysis pattern close to that observed for GRK2 in different cellular settings with intact Mdm2 expression (Figure 3; Penela *et al*, 2001). To further confirm that Mdm2 contributes to degradation of GRK2 in physiological conditions, we compared the protein decay of endogenous kinase by chase experiments in the presence of cycloheximide in both wild-type and Mdm2-deficient MEFs. Figure 5B shows that the degradation rate of GRK2 in MEFs lacking Mdm2 is slower than in wild-type MEFs in these conditions. Moreover, the steady-state expression of endogenous GRK2 is higher in Mdm2-deficient MEFs than in Mdm2-intact cells (compare lane 6 versus lane 1 in the lower panel of Figure 5B). Overall, these results indicate that Mdm2 is involved in degradation of GRK2 in endogenous conditions, and that this ligase plays a critical role in maintaining basal GRK2 turnover.

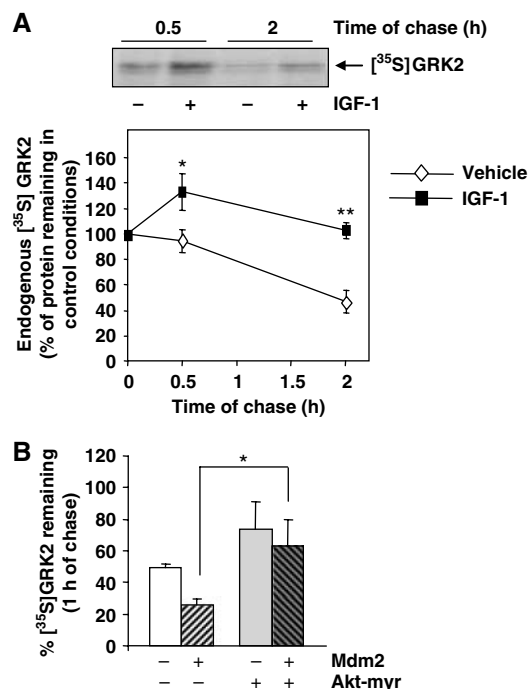
#### GRK2 stability is modulated by IGF-1 signaling via Mdm2 and the PI3K/Akt pathway

The experiments shown above demonstrate that GRK2 degradation requires Mdm2-dependent ubiquitination, and suggest that stimulation of GPCRs such as  $\beta_2$ AR may enhance



**Figure 5** GRK2 turnover is blocked in Mdm2-deficient cells. (A) Mdm2-null MEFs were transfected with wild-type GRK2 in the presence or absence of Mdm2. Degradation of the heterologous GRK2 protein was assessed after 1 h of chase as in previous figures. (B) Stability of endogenous GRK2 is increased in the absence of Mdm2 expression. GRK2 protein levels were examined by immunoblot analysis in both wild-type and Mdm2-deficient MEFs upon treatment with cycloheximide (CHX) for the indicated times. The amount of GRK2 at 0 h was defined as 100%, and data normalized by actin protein levels. In both the panels, data are the mean  $\pm$  s.e.m. of four independent experiments (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ). Representative gels are shown.

GRK2 turnover by facilitating the interaction of GRK2 with a  $\beta$ -arrestin-recruited pool of Mdm2. It has been recently reported that Mdm2 can also be recruited by  $\beta$ -arrestin molecules in response to activation of tyrosine kinase receptors such as the IGF1-R, thus promoting degradation of several targets including the receptor itself (Girnita *et al*, 2005). Therefore, we asked whether IGF1-R activation might elicit some modulatory effects on GRK2 stability. To this end, the degradation rate of endogenous GRK2 was determined by pulse-chase assays in the breast human carcinoma cell line MCF7, which expresses endogenous IGF1-R. Under normal conditions, GRK2 is degraded in MCF7 cells with a time course similar to that observed for this kinase in other cell types, and GRK2 half-life remains essentially unaltered when chasing MCF7 cells in low serum medium (data not shown), an experimental condition selected to analyze the potential effects of IGF-1 stimulation. Surprisingly, GRK2 degradation was markedly delayed at all chase points examined in cells challenged with IGF-1 as compared to untreated



**Figure 6** IGF receptor activation and Akt activity promote GRK2 stabilization. (A) Turnover of endogenous GRK2 was analyzed in MCF7 cells as detailed in Materials and methods in the presence of 50 ng/ml of IGF-1 or vehicle. Labeled proteins were immunoprecipitated with a specific anti-GRK2 antibody (C5/1.1). The density of the <sup>35</sup>S-labeled GRK2 band after the pulse period was taken as 100%. Data are mean  $\pm$  s.e.m. of 3–5 independent experiments. \* $P$  < 0.05; \*\* $P$  < 0.01. A representative fluorography is shown. (B) HEK-293 cells were transfected with different combinations of GRK2, Mdm2 and a constitutively active Akt mutant (Akt-myr) as indicated. GRK2 degradation rate was determined by pulse-chase analysis. Results (mean  $\pm$  s.e.m.) from three independent experiments are shown. \* $P$  < 0.05.

cells (~1.3-fold of protein decay between 0.5 and 2 h of chase in the presence of IGF-1 versus ~2-fold decay in its absence) (Figure 6A). Recently, several groups have reported that Akt interacts with and phosphorylates Mdm2 in response to activation of IGF1-R (Mayo and Donner, 2001; Feng *et al*, 2004) promoting its nuclear shuffling. Therefore, we hypothesized that Akt phosphorylation of the E3 ligase could impair Mdm2-dependent GRK2 degradation. To test this hypothesis, we performed pulse-chase assays in HEK-293 cells expressing GRK2 with a constitutively active mutant of Akt (Akt-myr). As shown in Figure 6B, GRK2 degradation is clearly diminished in the presence of Akt-myr as compared to the turnover of GRK2 alone ( $74 \pm 8\%$  of <sup>35</sup>S-labeled kinase remaining at 1 h of chase versus  $49 \pm 3\%$ , respectively). Interestingly, the expression of Akt-myr causes a dramatic change in the GRK2 proteolysis promoted by Mdm2 ( $63 \pm 15\%$  of protein remaining after 1 h of chase compared to  $26 \pm 3\%$  in the presence of Mdm2 only) (Figure 6B). These findings suggest that activation of Akt by IGF-1 signaling can prevent the effect of Mdm2 on GRK2 turnover, thus leading to kinase stabilization.

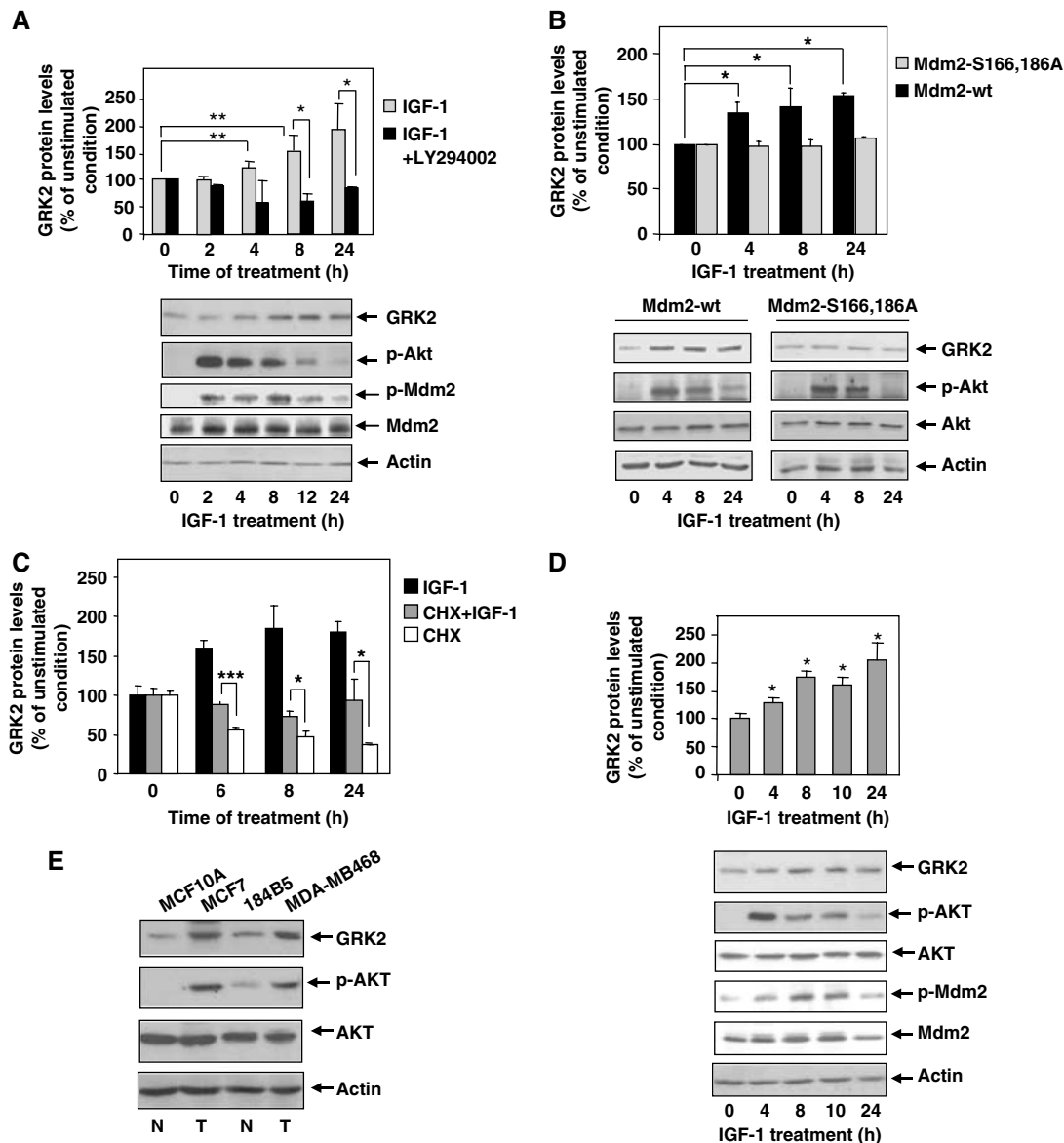
In line with these data, steady-state expression levels of endogenous GRK2 increase progressively in MCF7 cells upon treatment with IGF-1 as assessed by immunoblot analysis (Figure 7A). The increase was apparent after 4 h of incubation and attained a value of  $\approx$  two-fold at 24 h. Interestingly,

the peak activation of Akt upon IGF-1 challenge precedes the burst in GRK2 levels (Figure 7A, lower panel). Moreover, Akt-dependent phosphorylation of Mdm2, as detected with specific phospho-antibodies, correlates with the timing of GRK2 accumulation (Figure 7A, lower panel). This suggests that modification of Mdm2 by the PI3K/Akt pathway abrogates ligase activity towards GRK2 and therefore leads to protein accumulation. Consistent with this notion, IGF-1-mediated GRK2 upregulation was impeded in the presence of a PI3K inhibitor (Figure 7A), which also abolishes Akt activation and Mdm2 phosphorylation upon IGF-1 challenge (data not shown). Furthermore, IGF1-mediated GRK2 protein increase was not observed in MCF7 cells when an Mdm2 mutant unable to be modulated by the AKT/PI3K pathway (Mdm2 S166, 186A) was overexpressed (Figure 7B). Consistent with the idea that Akt phosphorylation of Mdm2 alters its ability to induce GRK2 degradation, the association of GRK2 with the Mdm2 mutant unable to be phosphorylated by Akt is notably increased, whereas that with an Mdm2 mutant that mimics such phosphorylation (Mdm2 S166, 186D) is severely impaired (Supplementary data and Supplementary Figure S4). Overall, these results indicate that modulation of Mdm2 by AKT plays a pivotal role in GRK2 stabilization.

In order to rule out that IGF1-R activation could enhance transcription and/or GRK2 protein synthesis by a PI3K/Akt-dependent pathway, we measured protein kinase levels in the presence of IGF-1 plus cycloheximide, a well-known protein synthesis inhibitor. As shown in Figure 7C, treatment of MCF7 cells in the presence of this compound alone leads to a reduction in GRK2 protein levels, which is detected as earlier as 6 h of incubation, as it would be expected for a short-lived protein. Interestingly, IGF-1 challenge can relieve the protein decay of GRK2 due to the cycloheximide-dependent inhibition of protein synthesis, thereby confirming that modulation of GRK2 stability is the main process targeted by IGF-1-dependent activation of Akt. Moreover, these findings also indicate that modulation of GRK2 turnover by IGF-1 stimulation does not require synthesis of any protein factor.

Confirming the physiological relevance of the modulation of GRK2 expression levels by the PI3K/AKT/Mdm2 axis observed in the MCF7 breast cancer cell line, GRK2 was similarly upregulated upon IGF-1 challenge in several other transformed cells such as the breast epithelial MDA-MB468 and the melanoma B16F10 cell lines (Supplementary data and Supplementary Figure S5). Interestingly, GRK2 protein accumulation is also triggered by IGF1-R activation in MCF10A cells, a non-transformed mammary epithelial cell line in which the pattern of Akt activation and of downstream phosphorylation of Mdm2 also correlate with GRK2 upregulation (Figure 7D). Moreover, silencing of Akt activity by addition of a pharmacological inhibitor completely prevents the increase in GRK2 protein triggered by IGF-1 both in transformed (MB468) and non-transformed (MCF10A) cell lines (Supplementary data and Supplementary Figure S6A and B). Cycloheximide-dependent downregulation of GRK2 expression was also prevented in the presence of IGF-1 in the non-transformed cell line (Supplementary Figure S6B).

Taken together, these results indicate that the IGF-1/Akt/Mdm2 regulatory axis of GRK2 turnover operates in different cell types, and suggest that upregulation of GRK2 by this novel modulatory mechanism might take place in some cellular contexts of malignant transformation. In this regard,



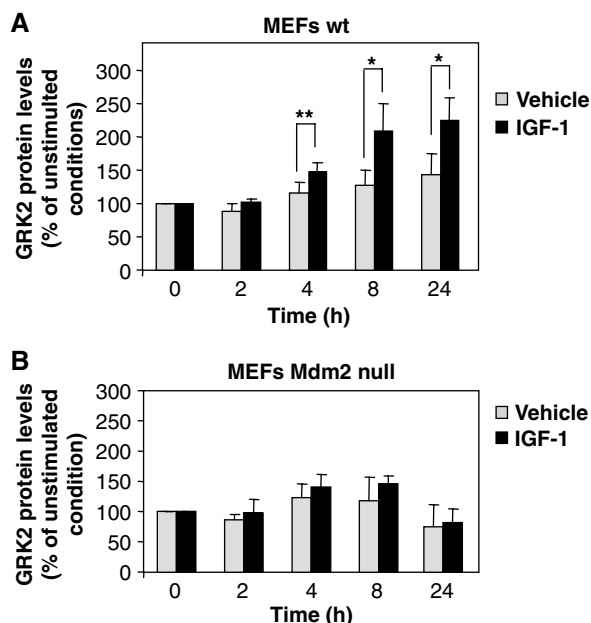
**Figure 7** IGF-1 stimulation induces endogenous GRK2 protein accumulation in a PI3K-dependent manner. (A) MCF7 cells were serum-starved for 12 h and challenged with IGF-1 (50 ng/ml) for different times in the presence or absence of the PI3K inhibitor LY294002 (10  $\mu$ M). Cells were subjected to immunoblot analysis with anti-GRK2, anti-Akt-pSer473, anti-Mdm2-pSer166 and anti-Mdm2 antibodies. GRK2 band densities were normalized by actin protein levels and expressed as percentage of GRK2 level in unstimulated conditions. Data are mean  $\pm$  s.e.m. of five independent experiments performed in duplicate. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01. (B) IGF-1-dependent upregulation of GRK2 is prevented by expression of an Mdm2 mutant defective in Akt-mediated phosphorylation. MCF7 cells transiently overexpressing either wild-type Mdm2 or the ligase mutant Mdm2 S166, 186A were serum-starved as above and stimulated with IGF-1 (50 ng/ml) for the indicated times. Expression levels of GRK2, Akt-pSer473, Akt and actin were determined by immunoblotting. Data were analyzed and depicted as in panel A. Representative blots are shown. (C) IGF-1 increases GRK2 protein by decreasing its degradation rate without altering its protein synthesis. Endogenous GRK2 protein levels were determined by immunoblot analysis in MCF7 cells stimulated with IGF-1 as above in the presence or absence of cycloheximide and compared with cycloheximide treatment alone. Data are mean  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments. \* $P$  < 0.05; \*\*\* $P$  < 0.001. (D) GRK2 protein accumulation is induced by IGF-1 challenge, in the non-transformed mammary cell line MCF10A. Cells were treated as above and levels of GRK2, Akt-pSer473, Akt, Mdm2-pSer166, Mdm2 and actin immunodetected with specific antibodies. The patterns of Akt activation, Mdm2 phosphorylation and GRK2 protein increase are similar to those observed in MCF7 cells. (E) Transformed mammary cells display higher levels of Akt activity and GRK2 protein. Both malignant transformed (T, MDA-MB486 and MCF7) and non-transformed cells (N, MCF10A and 184B5) were lysed in RIPA buffer and expression levels of GRK2, Akt-pSer473, Akt and actin were determined as above. Representative blots from three independent experiments are displayed.

we find that mammary transformed cells show higher cellular levels of GRK2 when compared to normal cells, in parallel with higher activation of AKT (Figure 7E).

Finally, to further establish the involvement of Mdm2 in the stabilization of GRK2 promoted by the IGF-1/PI3K/Akt activation axis, we compared the effect of IGF-1 challenge on

endogenous GRK2 levels in both wild-type and Mdm2-deficient MEFs (Figure 8). We find that GRK2 protein is accumulated in response to IGF-1 in MEFs expressing Mdm2 (panel A) with a time course and to an extent similar to those observed in MCF7 cells. Remarkably, in MEFs isolated from Mdm2-knockout mice, the absence of the ligase precludes





**Figure 8** Knockdown of Mdm2 prevents endogenous GRK2 protein accumulation in response to IGF-1. Wild-type (A) and Mdm2-deficient MEFs (B) were treated with IGF-1 or vehicle for the indicated times as in Figure 7. GRK2 protein levels were determined by Western blot analysis and normalized by actin expression. Data are mean  $\pm$  s.e.m. of four experiments performed in triplicate, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

any significant change in GRK2 expression upon IGF-1 treatment (panel B), despite the fact that these cells display an IGF1-R-dependent activation of the PI3K/Akt pathway similar to that detected in normal MEFs (data not shown). Overall, these results demonstrate that IGF1-R stimulation modulates GRK2 cellular levels by a mechanism involving the PI3K/Akt pathway and the Mdm2 E3 ligase.

## Discussion

The Mdm2 oncoprotein is an E3-ubiquitin ligase best known by its role in controlling p53 degradation and transcriptional activity (Yang *et al*, 2004; Bond *et al*, 2005). Growing evidence indicates that other proteins interact with Mdm2 and can be regulated by this ligase (Lin *et al*, 2002; Grinta *et al*, 2003; Iwakuma and Lozano, 2003; Jin *et al*, 2003; Pan and Chen, 2003; Uchida *et al*, 2005). In this report, we identify GRK2 as a new Mdm2 target.

Several lines of evidence support the notion that Mdm2 serves as an E3 ligase for GRK2 ubiquitination and is critical for modulating its degradation and cellular levels. First, a pool of endogenous GRK2 and Mdm2 can be found in the same molecular complex, as indicated by co-immunoprecipitation of both proteins under basal conditions. Moreover, stimulation of the  $\beta_2$ AR promotes a marked and transient increase in the endogenous GRK2/Mdm2 association, suggesting that this is a modulated and specific process. Second, overexpression of Mdm2 markedly increases the extent of 'in situ' GRK2 ubiquitination in both basal and agonist-stimulated conditions, rescues the defective degradation of the GRK2 mutant GRK2-K220R and enhances GRK2 proteolysis to an extent similar to that promoted by receptor stimulation, supporting the idea that Mdm2 is a key ligase

mediating agonist-dependent GRK2 ubiquitination and subsequent proteasome degradation. Third, GRK2 ubiquitination and turnover is significantly impaired in Mdm2-deficient MEFs compared to wild-type cells, which results in increased endogenous GRK2 protein levels. Restoration of ligase expression in Mdm2-knockout cells rescues GRK2 degradation, leading to a turnover rate similar to that observed in different cell types with native Mdm2 expression. Finally, we find that modulation of Mdm2 by the PI3K/Akt pathway upon IGF1-R stimulation alters GRK2 degradation and augments kinase cellular levels, putting forward a new mechanism for controlling GRK2 expression.

Mdm2 has been shown to control ubiquitination and stability of different molecules in response to membrane receptor occupancy (Shenoy *et al*, 2001; Grinta *et al*, 2005).  $\beta_2$ AR stimulation leads to the recruitment of Mdm2 to the receptor complex in a  $\beta$ -arrestin-dependent manner. Both  $\beta$ -arrestin1 and  $\beta$ -arrestin2 are able to interact with Mdm2 (Wang *et al*, 2003) and therefore to bring this ligase to the vicinity of activated receptors. We have found that  $\beta$ -arrestin1 also plays a role in GRK2 degradation by facilitating the  $\beta$ -agonist-triggered GRK2/Mdm2 association. Consistently, GRK2 protein decay and ubiquitination pattern are also markedly altered in  $\beta$ -arrestin1/2-knockout MEFs. These findings are compatible with a sequence of events in which Mdm2 is recruited to the receptor complex at the plasma membrane, where the ligase would sequentially ubiquitinate several targets in a  $\beta$ -arrestin-dependent manner.

As Mdm2 preferentially associates to  $\beta$ -arrestins in their basal receptor-unbound conformation (Song *et al*, 2006), it is feasible that  $\beta$ -arrestin might deliver Mdm2 to the receptor complex in an active form that is suitable to interact with and promote GRK2 ubiquitination, as has been reported for other targets (Shenoy *et al*, 2001; Wang *et al*, 2003). Mdm2 shuttles back and forth between the nucleus and the cytoplasm as a result of its interaction with different proteins. In this regard, it has been reported that  $\beta$ -arrestin2 promotes Mdm2 cytoplasmic relocation (Wang *et al*, 2003), whereas  $\beta$ -arrestin1 might cooperate with  $\beta$ -arrestin2 in the maintenance of an accessible cytosolic pool of Mdm2 for degradation of targets such as GRK2 in response to specific stimuli. In line with this idea, disruption of Mdm2 shuttling by promoting its nuclear retention with LMB, which also alters the balance between nuclear and cytoplasmic pools of  $\beta$ -arrestin2 (Scott *et al*, 2002; Wang *et al*, 2003), markedly affects GRK2 stability, retarding kinase degradation and increasing the steady-state levels of endogenous GRK2.

Although Mdm2 emerges as a crucial ligase involved in GRK2 degradation, the contribution of other ligase activities to GRK2 ubiquitination cannot be ruled out.  $\beta$ -Arrestin has been suggested to recruit additional ubiquitin ligases to the  $\beta_2$ AR complex (Shenoy *et al*, 2001). On the other hand, it has been described that Mdm2 mediates multiple monoubiquitination attachment to its prototypical target p53, whereas p300 mediates subsequent polyubiquitination acting as an E4 ligase (Lai *et al*, 2001; Grossman *et al*, 2003). Although a comprehensive map of GRK2 sites involved in ubiquitination awaits further research, our results point to lysines 19, 21, 30 and 31 as critical residues involved in both mono- and polyubiquitination of GRK2 (see also Supplementary data). Our results are compatible with Mdm2 mediating directly either types of ubiquitination or, alternatively, multiple or

single monoubiquitination that would prime subsequent polyubiquitination by another ligase in a  $\beta$ -arrestin-mediated manner.

The dependence of GRK2 degradation on Mdm2 function opens the possibility that factors affecting the activity as well as subcellular localization of this E3 ligase may modulate GRK2 turnover (Meek and Knippschild, 2003). In this regard, several groups have reported the ability of Akt to phosphorylate Mdm2 at residues 166 and 186 or 188 (Mayo and Donner, 2001; Ashcroft *et al*, 2002; Feng *et al*, 2004; Milne *et al*, 2004). In response to the IGF-1, the Akt-dependent phosphorylation of Mdm2 stimulates translocation of the ligase from the cytoplasm to the nucleus (Mayo and Donner, 2001; Zhou *et al*, 2001) and its stabilization (Feng *et al*, 2004). Although this scenario favors the downregulation of p53 by Mdm2, it may hamper the Mdm2-dependent regulation of other cellular targets. In keeping with this idea, we show that IGF-1 stimulation promotes GRK2 protein accumulation in different cell types by diminishing its degradation rate. The stabilization of GRK2 promoted by IGF-1 challenge does not depend on protein synthesis, and requires both the activation of the PI3K/Akt pathway and Mdm2 expression, as IGF-1 effect is abolished in the presence of PI3K inhibitors as well as in Mdm2-knockout cells. Upregulation of GRK2 by IGF-1 in MCF7 cells is prevented upon overexpression of an Mdm2 mutant unable to be phosphorylated by Akt, in line with the notion that Akt-mediated phosphorylation of Mdm2 is required for the effects on GRK2 stability.

The fact that GRK2 turnover is retarded by IGF1-R activation but enhanced by GPCR stimulation might be explained by differences in the composition or sequential assembly of the receptor multimolecular complexes, particularly regarding GRK2 recruitment. It is also possible that IGF1-R activation modulates phosphorylation of  $\beta$ -arrestins, as recently reported for insulin receptor activation (Hupfeld *et al*, 2005), thus impairing their function as scaffolds in the GRK2 degradation process. Alternatively, or in addition, IGF-1 signaling could trigger modifications of either Mdm2 or  $\beta$ -arrestins that would alter their capacity to promote efficient GRK2 degradation. Consistently, GRK2 displays differential association with Mdm2 mutants that either mimic or prevent Akt phosphorylation; however, whether Akt-dependent phosphorylation of Mdm2 hampers the ligase-mediated degradation of GRK2 by altering direct protein-protein interactions between Mdm2 and GRK2 or by keeping away these proteins in the cell, or both, remains to be determined.

Altered expression of GRK2 has been associated to several human diseases and reported in animal models of different pathologies. GRK2 protein levels were found to be downregulated in RA (Lombardi *et al*, 1999), in multiple sclerosis (Vroon *et al*, 2005) and in models of ischemic heart damage (Girnit *et al*, 2005). GRK2 is upregulated in other pathological settings, such as human congestive heart failure or hypertension (Metaye *et al*, 2005; Penela *et al*, 2006). It is worth noting that modification of kinase stability emerges as an important process that may trigger aberrant GRK2 expression in different situations. Increased GRK2 degradation has been reported in RA (Lombardi *et al*, 1999). Interestingly, the expression of Mdm2 has been found to be upregulated in samples from RA patients (Taranto *et al*, 2005), thus raising the intriguing possibility that Mdm2 might contribute to the observed decay in GRK2 protein in these patients. Whether

Mdm2 might be altered functionality in other diseases characterized by changes in GRK2 expression levels deserves to be explored.

On the other hand, as our data indicate that control of Mdm2 protein levels, activity or localization can influence GRK2 protein stability, it is conceivable that dysfunction of the PI3K/Akt pathway might result in altered GRK2 regulation in different cell types. Interestingly, a significant proportion of primary human breast tumors displays increased Akt activity and Akt-dependent Mdm2 phosphorylation (Zhou *et al*, 2001), which are critical markers for tumor progression. In those samples positive for Neu/Akt, Mdm2 was mainly localized in the nucleus, in contrast to the mixed nuclear and cytoplasmic distribution of the ligase in the Neu/Akt-negative breast tumors. Although the expression of GRK2 in tumor tissues has not been addressed in detail, it is tempting to suggest that deregulated Akt activity, by relieving the Mdm2-dependent degradation of GRK2, could stabilize the kinase and play a role in GRK2 upregulation reported by others in some human tumor malignancies (Metaye *et al*, 2002; King *et al*, 2003). Further studies will be needed to explore the functional interplay of the PI3K/Akt/ Mdm2/GRK2 axis and their relevance in physiological and malignant cell growth.

## Materials and methods

### Materials and plasmids

See Supplementary data.

### Site-directed mutagenesis

See Supplementary data.

### Cell culture and transfection

HEK-293, MCF-7, wild-type and Mdm2/p53 double-null MEFs were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium plus 10% (v/v) fetal bovine serum at 37°C in a humidified 5% atmosphere. Cells grown to 80% confluence in 60 mm dishes were transfected with the indicated plasmids (5  $\mu$ g of total DNA) by using the LipofectAmine (HEK-293) or the FuGENE6 (MCF7 and MEFs) reagents. Empty vector was added as needed to keep the total amount of DNA transfected constant.

### Cell treatment and metabolic labeling

See Supplementary data.

### Immunoprecipitation and Western blot analysis

Cells were lysed in buffer A (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 10% glycerol, with a cocktail of protease inhibitors) for 1 h at 4°C and then centrifuged (15 000 g, 10 min). Supernatants were incubated with a specific agarose-conjugated anti-Mdm2 monoclonal antibody (SMP14, Santa Cruz Biotechnology) or with anti-GRK2 monoclonal antibody (clone C5/1.1, Upstate). Immune complexes were resolved in 7.5% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Blots were probed with a specific GRK2 polyclonal antibody AbFP2 (Murga *et al*, 1996) or with an Mdm2 polyclonal antibody (N-20, Santa Cruz Biotechnology). After membrane stripping, the same blots were re-probed with the corresponding antibodies directed against the immunoprecipitated proteins. Blots were developed using a chemiluminescent method (ECL, Amersham). Band density was quantitated by laser densitometric analysis.

### Ubiquitination assays

HEK-293 cells seeded in 100 mm dishes were transfected with different combinations of expression vectors for HA-ubiquitin,  $\beta_2$ AR, Mdm2 and wild-type GRK2 or the GRK2-K19,21,30,31R mutant. After 2 h of serum starving, cells were either left untreated or stimulated with 10  $\mu$ M isoproterenol for the indicated times. Cells that were not challenged with any agonist were maintained in the presence of serum. Subsequently, cells were lysed in 1 ml of 20 mM

Tris-HCl (pH 7.4), 0.3 M NaCl, 1% Triton-X100 and 0.5% sodium deoxycholate supplemented with 5 mM *N*-ethyl-maleimide. Ubiquitin conjugates were purified by immunoprecipitation with a monoclonal anti-HA antibody (12CA5, Roche Molecular Biochemicals) or with a specific monoclonal anti-ubiquitin antibody that does not crossreact with free ubiquitin molecules (FK2, Affinity). The presence of ubiquitinated GRK2 was then analyzed by Western blot analysis as described (Penela *et al*, 1998). Similar GRK2 and ubiquitin expression levels were confirmed in cell lysates by dot blot and Western blot using their specific antibodies. For analysis of endogenous ubiquitination, MEF cells were grown at confluency in 150 mm dishes and treated as above. Ubiquitin conjugates of GRK2 were detected by immunoprecipitation of GRK2 protein with a monoclonal antibody (clone C5/1.1, Upstate) and immunoblotting with the FK2 antibody.

## References

- Ashcroft M, Ludwig RL, Woods DB, Copeland TD, Weber HO, MacRae EJ, Vousden KH (2002) Phosphorylation of HDM2 by Akt. *Oncogene* **21**: 1955–1962
- Bond GL, Hu W, Levine AJ (2005) MDM2 is a central node in the p53 pathway: 12 years and counting. *Curr Cancer Drug Targets* **5**: 3–8
- Elorza A, Penela P, Sarnago S, Mayor Jr F (2003) MAPK-dependent degradation of G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem* **278**: 29164–29173
- Feng J, Tamaskovic R, Yang Z, Brazil DP, Merlo A, Hess D, Hemmings BA (2004) Stabilization of Mdm2 via decreased ubiquitination is mediated by protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation. *J Biol Chem* **279**: 35510–35517
- Ferguson SS (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* **53**: 1–24
- Freedman NJ, Kim LK, Murray JP, Exum ST, Brian L, Wu JH, Peppel K (2002) Phosphorylation of the platelet-derived growth factor receptor-beta and epidermal growth factor receptor by G protein-coupled receptor kinase-2. Mechanisms for selectivity of desensitization. *J Biol Chem* **277**: 48261–48269
- Gainetdinov RR, Premont RT, Bohn LM, Lefkowitz RJ, Caron MG (2004) Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu Rev Neurosci* **27**: 107–144
- Girnita L, Girnita A, Larsson O (2003) Mdm2-dependent ubiquitination and degradation of the insulin-like growth factor 1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 8247–8252
- Girnita L, Shenoy SK, Sehat B, Vasilcanu R, Girnita A, Lefkowitz RJ, Larsson O (2005) {beta}Arrestin is crucial for ubiquitination and down-regulation of the insulin-like growth factor-1 receptor by acting as adaptor for the MDM2 E3 ligase. *J Biol Chem* **280**: 24412–24419
- Grossman SR, Deato ME, Brignone C, Chan HM, Kung AL, Tagami H, Nakatani Y, Livingston DM (2003) Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science* **300**: 342–344
- Hildreth KL, Wu JH, Barak LS, Exum ST, Kim LK, Peppel K, Freedman NJ (2004) Phosphorylation of the platelet-derived growth factor receptor-beta by G protein-coupled receptor kinase-2 reduces receptor signaling and interaction with the Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor. *J Biol Chem* **279**: 41775–41782
- Ho J, Cocolakis E, Dumas VM, Posner BI, Laporte SA, Lebrun JJ (2005) The G protein-coupled receptor kinase-2 is a TGFbeta-inducible antagonist of TGFbeta signal transduction. *EMBO J* **24**: 3247–3258
- Hupfeld CJ, Resnik JL, Ugi S, Olefsky JM (2005) Insulin-induced beta-arrestin1 Ser-412 phosphorylation is a mechanism for desensitization of ERK activation by Galphai-coupled receptors. *J Biol Chem* **280**: 1016–1023
- Iwakuma T, Lozano G (2003) MDM2, an introduction. *Mol Cancer Res* **1**: 993–1000
- Jin Y, Lee H, Zeng SX, Dai MS, Lu H (2003) MDM2 promotes p21waf1/cip1 proteasomal turnover independently of ubiquitylation. *EMBO J* **22**: 6365–6377
- King DW, Steinmetz R, Wagoner HA, Hannon TS, Chen LY, Eugster EA, Pescovitz OH (2003) Differential expression of GRK isoforms

## Supplementary data

Supplementary data are available at *The EMBO Journal* Online (<http://www.embojournal.org>).

## Acknowledgements

We thank Susana Rojo and Lucía Horrillo for skillful technical and secretarial assistance, respectively, and Drs G Lozano, L Mayo, RJ Lefko Witz, M Hung and M Serrano for experimental tools. This work was supported by grants from Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2002-0408 and SAF2005-03053), Fundación Ramón Areces and the MAIN European Network (LSHG-CT-2003-502935). PP is a recipient of a Ramón y Cajal contract.

- in nonmalignant and malignant human granulosa cells. *Endocrine* **22**: 135–142
- Kohout TA, Lefkowitz RJ (2003) Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol Pharmacol* **63**: 9–18
- Lai Z, Ferry KV, Diamond MA, Wee KE, Kim YB, Ma J, Yang T, Benfield PA, Copeland RA, Auger KR (2001) Human mdm2 mediates multiple mono-ubiquitination of p53 by a mechanism requiring enzyme isomerization. *J Biol Chem* **276**: 31357–31367
- Lain S, Midgley C, Sparks A, Lane EB, Lane DP (1999) An inhibitor of nuclear export activates the p53 response and induces the localization of HDM2 and p53 to U1A-positive nuclear bodies associated with the PODs. *Exp Cell Res* **248**: 457–472
- Lefkowitz RJ, Shenoy SK (2005) Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* **308**: 512–517
- Lin FT, Chen W, Shenoy S, Cong M, Exum ST, Lefkowitz RJ (2002) Phosphorylation of beta-arrestin2 regulates its function in internalization of beta(2)-adrenergic receptors. *Biochemistry* **41**: 10692–10699
- Lin FT, Daaka Y, Lefkowitz RJ (1998) beta-arrestins regulate mitogenic signaling and clathrin-mediated endocytosis of the insulin-like growth factor I receptor. *J Biol Chem* **273**: 31640–31643
- Lombardi MS, Kavelaars A, Schedlowski M, Bijlsma JW, Okihara KL, Van de Pol M, Ochsmann S, Pawlak C, Schmidt RE, Heijnen CJ (1999) Decreased expression and activity of G-protein-coupled receptor kinases in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J* **13**: 715–725
- Mayo LD, Donner DB (2001) A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 11598–11603
- Meek DW, Knippschild U (2003) Posttranslational modification of MDM2. *Mol Cancer Res* **1**: 1017–1026
- Metaye T, Gibelin H, Perdrisot R, Kraimps JL (2005) Pathophysiological roles of G-protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal* **17**: 917–928
- Metaye T, Menet E, Guilhot J, Kraimps JL (2002) Expression and activity of g protein-coupled receptor kinases in differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **87**: 3279–3286
- Milne D, Kampanis P, Nicol S, Dias S, Campbell DG, Fuller-Pace F, Meek D (2004) A novel site of AKT-mediated phosphorylation in the human MDM2 onco-protein. *FEBS Lett* **577**: 270–276
- Murga C, Ruiz-Gomez A, Garcia-Higuera I, Kim CM, Benovic JL, Mayor Jr F (1996) High affinity binding of beta-adrenergic receptor kinase to microsomal membranes. Modulation of the activity of bound kinase by heterotrimeric G protein activation. *J Biol Chem* **271**: 985–994
- Pan Y, Chen J (2003) MDM2 promotes ubiquitination and degradation of MDMX. *Mol Cell Biol* **23**: 5113–5121
- Penela P, Elorza A, Sarnago S, Mayor Jr F (2001) Beta-arrestin- and c-Src-dependent degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *EMBO J* **20**: 5129–5138
- Penela P, Murga C, Ribas C, Tutor AS, Peregrin S, Mayor Jr F (2006) Mechanisms of regulation of G-protein-coupled receptor kinases (GRKs) and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* **69**: 46–56
- Penela P, Ribas C, Mayor Jr F (2003) Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal* **15**: 973–981

- Penela P, Ruiz-Gomez A, Castano JG, Mayor Jr F (1998) Degradation of the G protein-coupled receptor kinase 2 by the proteasome pathway. *J Biol Chem* **273**: 35238–35244
- Pickart CM (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* **70**: 503–533
- Rodriguez MS, Desterro JM, Lain S, Lane DP, Hay RT (2000) Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* **20**: 8458–8467
- Scott MG, Le Rouzic E, Perianin A, Pierotti V, Enslen H, Benichou S, Marullo S, Benmerah A (2002) Differential nucleocytoplasmic shuttling of beta-arrestins. Characterization of a leucine-rich nuclear export signal in beta-arrestin2. *J Biol Chem* **277**: 37693–37701
- Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2003) Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J* **375**: 503–515
- Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2005) Receptor-specific ubiquitination of beta-arrestin directs assembly and targeting of seven-transmembrane receptor signalosomes. *J Biol Chem* **280**: 15315–15324
- Shenoy SK, McDonald PH, Kohout TA, Lefkowitz RJ (2001) Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science* **294**: 1307–1313
- Song X, Raman D, Gurevich EV, Vishnivetskiy SA, Gurevich VV (2006) Visual and both non-visual arrestins in their inactive conformation bind JNK3 and Mdm2 and relocalize them from the nucleus to the cytoplasm. *J Biol Chem* **281**: 21491–21499
- Taranto E, Xue JR, Lacey D, Hutchinson P, Smith M, Morand EF, Leech M (2005) Detection of the p53 regulator murine double-minute protein 2 in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **32**: 424–429
- Uchida C, Miwa S, Kitagawa K, Hattori T, Isobe T, Otani S, Oda T, Sugimura H, Kamijo T, Ookawa K, Yasuda H, Kitagawa M (2005) Enhanced Mdm2 activity inhibits pRB function via ubiquitin-dependent degradation. *EMBO J* **24**: 160–169
- Vroon A, Kavelaars A, Limmroth V, Lombardi MS, Goebel MU, Van Dam AM, Caron MG, Schedlowski M, Heijnen CJ (2005) G protein-coupled receptor kinase 2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **174**: 4400–4406
- Wang P, Gao H, Ni Y, Wang B, Wu Y, Ji L, Qin L, Ma L, Pei G (2003) Beta-arrestin 2 functions as a G-protein-coupled receptor-activated regulator of oncoprotein Mdm2. *J Biol Chem* **278**: 6363–6370
- Weissman AM (2001) Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 169–178
- Yang Y, Li CC, Weissman AM (2004) Regulating the p53 system through ubiquitination. *Oncogene* **23**: 2096–2106
- Zhou BP, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B, Hung MC (2001) HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol* **3**: 973–982